

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH TECHNOLOGIÍ  
ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

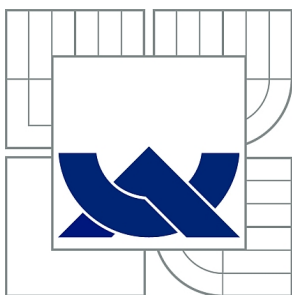
AUTOMATICKÁ ÚPRAVA OBRAZŮ Z 1D GELOVÉ ELEKTROFORÉZY

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE  
BACHELOR'S THESIS

AUTOR PRÁCE  
AUTHOR

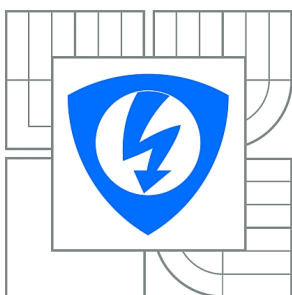
MARTIN KOVÁŘ

BRNO 2013



**VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ**

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



**FAKULTA ELEKTROTECHNIKY A KOMUNIKAČNÍCH  
TECHNOLOGIÍ**

**ÚSTAV BIOMEDICÍNSKÉHO INŽENÝRSTVÍ**

FACULTY OF ELECTRICAL ENGINEERING AND COMMUNICATION  
DEPARTMENT OF BIOMEDICAL ENGINEERING

# **AUTOMATICKÁ ÚPRAVA OBRAZŮ Z 1D GELOVÉ ELEKTROFORÉZY**

AUTOMATIC IMPROVEMENTS OF IMAGES FROM 1D GEL ELECTROPHORESIS

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

BACHELOR'S THESIS

**AUTOR PRÁCE**

AUTHOR

**MARTIN KOVÁŘ**

**VEDOUCÍ PRÁCE**

SUPERVISOR

**Ing. HELENA ŠKUTKOVÁ**

BRNO 2013



**VYSOKÉ UČENÍ  
TECHNICKÉ V BRNĚ**

**Fakulta elektrotechniky  
a komunikačních technologií**

**Ústav biomedicínského inženýrství**

# **Bakalářská práce**

bakalářský studijní obor

**Biomedicínská technika a bioinformatika**

**Student:** Martin Kovář

**ID:** 136476

**Ročník:** 3

**Akademický rok:** 2012/2013

## **NÁZEV TÉMATU:**

**Automatická úprava obrazů z 1D gelové elektroforézy**

## **POKYNY PRO VYPRACOVÁNÍ:**

1) Nastudujte problematiku 1D gelové elektroforézy a její specifikace pro aplikaci v mikrobiologii, genomice a proteomice. Zaměřte se na zkreslení a chyby vznikající v průběhu elektroforetického procesu. 2) Navrhněte a realizujte algoritmus pro automatickou detekci linií vzorků na gelu. 3) Zajistěte robustnost algoritmu proti typickým zkreslením snímku gelu z 1D elektroforézy jako jsou „smile effect“, prolnutí linek, parazitní gradient v gelu apod. 4) Detekované linie vzorků převedte na 1D signály a filtrujte šum v signálu způsobený nečistotami ve vzorku. 5) Určete pozice jednotlivých bandů vzorku a na základě použitého „ladderu“ interpolujte jejich velikost. 6) Body 2-5 zakomponujte do programu s uživatelským rozhraním, jehož výstupem bude upravený šedotónový obraz gelu získaný zpětným převodem 1D signálů na 2D obraz. 7) Vizuálně vyhodnoťte účinnost navržených algoritmů na reálných snímcích gelu s různými typy zkreslení.

## **DOPORUČENÁ LITERATURA:**

[1] SOUSA, Antonio V., Rui AGUIAR, Ana Maria MENDONCA a Aurelio CAMPILHO. Automatic Lane and Band Detection in Images of Thin Layer Chromatography. Image Analysis and Recognition. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004 2004, s. 158-165.

[2] WALLIS, Yvonne. Denaturing gradient gel electrophoresis. Methods In Molecular Biology. 2002, roč. 187, č. 16, s. 125-135.

**Termín zadání:** 11.2.2013

**Termín odevzdání:** 31.5.2013

**Vedoucí práce:** Ing. Helena Škutková

**Konzultanti bakalářské práce:**

**prof. Ing. Ivo Provazník, Ph.D.**

*Předseda oborové rady*

**UPOZORNĚNÍ:**

Autor bakalářské práce nesmí při vytváření bakalářské práce porušit autorská práva třetích osob, zejména nesmí zasahovat nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a musí si být plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č.40/2009 Sb.

# ABSTRAKT

V této bakalářské práci jsou vysvětleny základní principy elektroforézy a jejích modalit se zaměřením na 1D gelovou elektroforézu. Popisuje analýzu elektroforeogramu a příčiny jeho zkreslení, a uvádí specifikace aplikací metody v mikrobiologii, genomice a proteomice.

Praktická část prezentuje vývoj, optimalizaci a výstupy programu pro automatickou analýzu elektroforeogramů, vytvořeného v prostředí Matlab. Analýza zahrnuje detekci linií a proužků v obrazu a výpočet molekulárních hmotností vzorků. Závěr práce tvoří hodnocení účinnosti detekce a přesnosti výpočtu hmotností.

# KLÍČOVÁ SLOVA

Gelová elektroforéza, PAGE, elektroforeogram, elektroforetogram, obraz gelu, zkreslení obrazu, automatická detekce, molekulární hmotnost, ladder, Matlab

# ABSTRACT

In this bachelor's thesis are explained the basic principles of electrophoresis and its modalities with focusing on 1D gel electrophoresis. It describes analysis of an electrophoreogram and causes of its possible distortion, and states specifications of applications of the method in microbiology, genomics and proteomics.

The practical part presents development, optimization and outputs of a programme for automatic electrophoreogram analysis, which was created in Matlab environment. The analysis contains lane and band detection and computation of samples' molecular weight. The ending of the thesis is constituted by evaluating efficiency of detection and accuracy of weight computation.

# KEYWORDS

Gel electrophoresis, PAGE, electrophoreogram, electrophoretogram, gel image, image distortion, automatic detection, molecular weight, ladder, Matlab

KOVÁŘ, M. *Automatická úprava obrazů z 1D gelové elektroforézy*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta elektrotechniky a komunikačních technologií, 2013. 48 s., 7 s. příloh. Vedoucí bakalářské práce Ing. Helena Škutková.

# PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci na téma Automatická úprava obrazů z 1D gelové elektroforézy jsem vypracoval samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou všechny citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce.

Jako autor uvedené bakalářské práce dále prohlašuji, že v souvislosti s vytvořením této práce jsem neporušil autorská práva třetích osob, zejména jsem nezasáhl nedovoleným způsobem do cizích autorských práv osobnostních a jsem si plně vědom následků porušení ustanovení § 11 a následujících autorského zákona č. 121/2000 Sb., včetně možných trestněprávních důsledků vyplývajících z ustanovení části druhé, hlavy VI. díl 4 Trestního zákoníku č. 40/2009 Sb.

V Brně dne 22. 5. 2013

.....

podpis autora

# PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce Ing. Heleně Škutkové za účinnou metodickou, pedagogickou a odbornou pomoc, za projevenou ochotu, cenné rady a neúnavné odpovídání na mé otázky při zpracování bakalářské práce. Také bych chtěl poděkovat své přítelkyni a rodině za podporu během tvorby práce a celé doby mého studia.

V Brně dne 22. 5. 2013

.....

podpis autora

# OBSAH

Seznam obrázků .....	x
Úvod .....	11
1. Elektroforéza .....	12
1.1. Princip .....	12
1.2. Modifikace elektroforézy .....	13
1.2.1. Volná elektroforéza .....	13
1.2.2. Kapilární elektroforéza .....	14
1.2.3. Rovnovážná elektroforéza .....	14
1.2.4. Zónová elektroforéza .....	14
1.2.5. Další varianty elektroforézy .....	16
1.3. Použití gelové elektroforézy v praxi .....	17
1.3.1. Praktické provedení .....	17
1.3.2. Vizualizace polohy separovaných molekul .....	18
1.3.3. Vyhodnocení elektroforeogramu .....	19
1.3.4. Aplikace v mikrobiologii, genomice a proteomice .....	20
1.4. Zkreslení a chyby .....	22
2. Analýza a zpracování obrazů gelu .....	23
2.1. Zvýšení kvality obrazu .....	23
2.2. Detekce linií .....	23
2.3. Detekce proužků .....	23
2.4. Realizace v praktické části .....	24
2.4.1. Filtrace obrazu .....	24
2.4.2. Detekce .....	24
3. Programové rozhraní .....	27
3.1. Načtení a úprava obrazu .....	27
3.2. Detekce vertikálních linií .....	27
3.3. Detekce horizontálních proužků .....	29



3.4.	Výpočet molekulárních hmotností vzorků .....	30
3.5.	Další funkce programu.....	32
4.	Testování účinnosti programu .....	33
4.1.	Ideál – binární obraz .....	33
4.2.	Žádné zkreslení .....	34
4.3.	Běžné zkreslení – zakřivené linie .....	35
4.4.	Běžné zkreslení – nehomogenní pozadí .....	37
4.5.	Silné zkreslení – smile efekt a šum .....	38
4.6.	Silné zkreslení – high salt efekt.....	39
4.7.	Výpočet molekulových hmotností.....	41
	Závěr.....	43
	Literatura .....	44
	Seznam použitých zkratk .....	47
	Seznam příloh.....	48
	Seznam příloh na CD .....	48
	Přílohy.....	I

# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Princip gelové elektroforézy DNA .....	15
Obr. 2: Elektroforeogram SDS-PAGE s označením molekulových hmotností.....	16
Obr. 3: Příklad výstupu 2D elektroforézy .....	17
Obr. 4: Vana pro horizontální elektroforézu .....	18
Obr. 5: Vzorek označený ethidium bromidem pod UV světlem .....	18
Obr. 6: DNA ladder pro 1% TAE agarózu .....	19
Obr. 7: Elektroforeogram DGGE .....	20
Obr. 8: Podoba gelu při použití Sangerovy metody .....	21
Obr. 9: Elektroforeogram izoelektrické fokusace .....	21
Obr. 10: Linie gelu s popisem separovaných složek krevního séra.....	21
Obr. 11: Smile efekt.....	22
Obr. 12: High Salt efekt .....	22
Obr. 13: Porovnání různých variant výpočtu horizontálního profilu .....	25
Obr. 14: Blokové schéma programu.....	27
Obr. 15: Automatická úprava kontrastu obrazu .....	27
Obr. 16: Úprava jasového profilu obrazu gelu s nehomogenním pozadím .....	28
Obr. 17: Normalizovaný horizontální profil elektroforeogramu z Obr. 16 .....	29
Obr. 18: Detekce proužků v linii .....	30
Obr. 19: Normalizace poloh vzorků v obrazu .....	31
Obr. 20: Interpolovaný průběh závislosti molekulové hmotnosti na normalizované výšce proužků.....	31
Obr. 21: Analýza binárního obrazu.....	33
Obr. 22: Analýza obrazu bez zkreslení .....	34
Obr. 23: Analýza obrazu se zakřivenými liniemi.....	35
Obr. 24: Binární obraz elektroforeogramu.....	36
Obr. 25: Vertikální profil první linie zleva elektroforeogramu z Obr. 23. ....	36
Obr. 26: Analýza obrazu s nehomogenním pozadím .....	37
Obr. 27: Analýza obrazu zkresleného „smile efektem“ a znehodnoceného šumem.....	38
Obr. 28: Vertikální profil první linie zleva elektroforeogramu z Obr. 27 .....	39
Obr. 29: Analýza obrazu silně zkresleného high salt efektem .....	40
Obr. 30: Vertikální profil druhé linie zleva elektroforeogramu z Obr. 29 .....	41
Obr. 31: Elektroforeogram s označenými hmotnostmi vzorků a jeho upravená podoba s detekovanými proužky .....	41
Obr. 32: Výpočet molekulárních hmotností vzorků .....	42

# ÚVOD

Elektroforéza představuje významnou laboratorní metodu pro separaci částic. Využitím elektrického pole jsme schopni částice uvést do pohybu a vzájemně oddělit. Pro zpřesnění analýzy je vhodné pohyby realizovat v médiu – nejběžněji v gelu. Po obarvení vzorků je obraz gelu, neboli elektroforeogram, zaznamenán a uložen v digitální podobě.

Vyhodnocení probíhá porovnáním pozice proužků (bandů) se standardem, kterým je „měřítko“ vytvořené částicemi s předem známou molekulovou hmotností. Klasické hodnocení zrakem je časově náročné a vnáší do analýzy subjektivní chybu. V tomto bodě nachází uplatnění automatizace vyhodnocení, s jejíž pomocí je možné proces výrazně zkrátit, zpřesnit a objektivizovat. V ideálním případě laborant pouze provede elektroforézu, obarví vzorek a zkontroluje výsledky v počítači. Gel je automaticky vyfotografován, obraz odeslán do počítače, analyzován a výsledky jsou uloženy, případně rovnou interpretovány. Dokonalé analýze však často brání zkreslení a chyby v obrazu. Z toho důvodu vznikají stále nové a dokonalejší algoritmy pro přesnou analýzu.

Automatizace by usnadnila práci odborníkům mnoha oborů, ve kterých se elektroforéza využívá. Jde o rozmanité aplikace v medicíně, mikrobiologii, genetice, antropologii či zemědělství. Moderní alternativou gelové elektroforézy je tzv. čipová elektroforéza, jejímiž výhodami jsou rychlost, přesnost, automatizovaný průběh a snadné vyhodnocení, velkému rozšíření však brání vysoké provozní náklady. Široké spektrum aplikací a finanční dostupnost dokazují, že i po několika desetiletích od svého vzniku je gelová elektroforéza v téměř nezměněné formě stále aktuální metodou, a to i přesto, že výsledné snímky jsou často nekvalitní a zkreslené.

Cílem této práce je vytvořit program s uživatelským rozhraním, který umožní jednoduchou, rychlou a spolehlivou analýzu poloh vzorků v gelu a vypočítání jejich molekulárních hmotností na základě porovnání s hmotnostním markerem. Důraz je kladen na zajištění odolnosti algoritmů detekce proti typickým zkreslením vzniklým během elektroforézy a proti nečistotám v gelu způsobujícím šum.

# 1. ELEKTROFORÉZA

Obsahem kapitoly je vysvětlení obecného principu elektroforézy a přehled nejvyužívanějších modalit elektroforézy se zaměřením na 1D gelovou elektroforézu.

## 1.1. Princip

Elektroforéza (dále EF) patří mezi elektromigrační separační metody a představuje významný nástroj analytické chemie. Využívá pohybu elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli, které je generováno mezi dvěma elektrodami ponořenými do roztoku. V tomto elektrolytu migrují konstantní rychlostí kationty analyzovaného vzorku k zápornému pólu systému (směrem ke katodě), anionty ke kladnému pólu (k anodě), elektricky neutrální částice se nepohybují. Rychlost pohybu je pro ionty různých vlastností rozdílná a lze charakterizovat veličinou nazývanou elektroforetická pohyblivost (mobilita)  $\mu_e$ . Elektroforetická pohyblivost částice lze definovat jako rychlost jejího pohybu v elektrickém poli o jednotkové intenzitě [1]. Rychlost částice tedy popisuje následující vztah:

$$v = \mu_e E, \quad (1)$$

kde  $v$  je rychlost iontu,  $\mu_e$  elektroforetická pohyblivost a  $E$  intenzita elektrického pole.

Při průchodu elektrolytem je částice brzděna odporem sil vnitřního tření, které se dostávají do rovnováhy se silou elektrického pole. Pro elektroforetickou pohyblivost platí:

$$\mu_e = F_E / F_T, \quad (2)$$

kde  $F_E$  je síla elektrického pole a  $F_T$  síla vnitřního tření.

Vyjádření velikosti obou sil:

$$F_E = qE, \quad (3)$$

kde  $q$  je náboj částice a  $E$  intenzita elektrického pole,

$$F_T = -6\pi\eta r v, \quad (4)$$

kde  $\eta$  je viskozita elektrolytu,  $r$  poloměr částice a  $v$  rychlost částice.

Po ustálení rovnováhy  $F_E$  a  $F_T$  lze tedy velikost pohyblivosti pomocí fyzikálních parametrů elektrolytu a analyzovaného vzorku definovat jako

$$\mu_e = \frac{q}{6\pi\eta r}, \quad (5)$$

Z tohoto vztahu je patrné, že elektroforetická pohyblivost je přímo úměrná náboji (čím větší je náboj částice, tím větší je její pohyblivost, resp. rychlost pohybu) a nepřímo úměrná viskozitě prostředí (čím větší viskozita, tím nižší rychlost pohybu) a poloměru (s rostoucím poloměrem částic klesá jejich rychlost pohybu). [2]

Ve skutečnosti však bývá obvykle naměřena nižší, tzv. efektivní pohyblivost. Ta je dána disociací slabých kyselin nebo zásad – jejich stupněm disociace  $\alpha$ . Potom

$$\mu_{e(\text{efektivní})} = \alpha * \mu_e. \quad (6)$$

Efektivní pohyblivost lze chápat i v obecnějším smyslu, kdy jsou zohledněny ještě další faktory uplatňující se v praxi, například koncentrace a pH základního roztoku, změna viskozity při změně teploty, nepravidelný (nekulovitý) tvar částic nebo vlastnosti gelového či jiného nosiče (viz dále).

Vzájemné rozdíly v elektroforetických efektivních pohyblivostech iontů ovlivňují účinnost separace – jen látky s dostatečně odlišnými pohyblivostmi mohou být úspěšně separovány. [1] [3]

## 1.2. Modifikace elektroforézy

Elektroforézu jako metodu pro separaci proteinů poprvé popsal roku 1937 švédský biochemik Arne Tiselius, kdy použil tzv. volnou elektroforézu [3]. Od té doby bylo vyvinuto mnoho dalších modifikací provedení elektroforézy, které lze dle [2] shrnout do 4 základních skupin:

- Volná elektroforéza (EF s pohyblivým rozhraním)
- Kapilární elektroforéza
- Rovnovážná elektroforéza (izoelektrická fokusace a izotachoforéza)
- Zonová elektroforéza (EF na nosičích)

### 1.2.1. Volná elektroforéza

Metodu lze realizovat v U-trubici s konci ponořenými do nádob s elektrodami. Působením elektrického pole částice podle svého náboje migrují k elektrodám. Účinnost separace však

znatelně snižuje difuze a konvekční proudění roztoku. Z toho důvodu byla zavedena elektroforéza prováděná v antikonvekčních médiích (např. gelová EF, viz dále). [2] [3]

### 1.2.2. Kapilární elektroforéza

Tato metoda, označovaná též jako vysokoúčinná kapilární EF (HPCE), se provádí v kapiláře s vnitřním průměrem v jednotkách až desítkách  $\mu\text{m}$ . Aktivace elektrického pole způsobí tok roztoku s analytem, jehož separace je snímána detektorem poblíž konce kapiláry. Vzhledem k použití antikonvekčních kapilár není nutné použití médií (gelů). Některé modifikace však pracují i s médii, např. kapilární gelová EF (CGE) či micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC). [2] [3]

### 1.2.3. Rovnovážná elektroforéza

**Izoelektrická fokusace (IEF)** je založena na vytvoření gradientu pH v médiu. Amfoterní nabitě molekuly analytu elektroforeticky migrují v gelu až do místa, kde pH prostředí odpovídá jejich izoelektrickému bodu. Zde se pohyb zastaví, neboť molekula získá nulový náboj. Takto lze separovat molekuly s izoelektrickým bodem odlišným o 0,001 jednotky pH. [2]

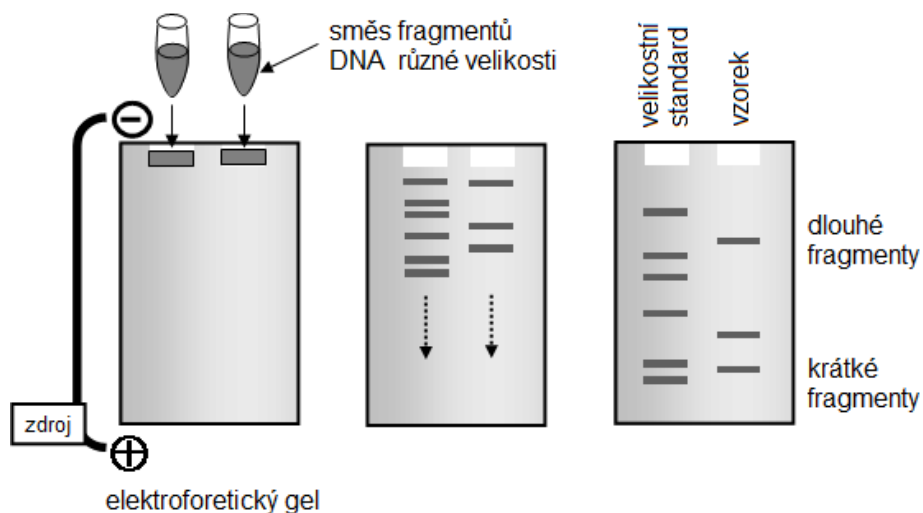
**Izotachoforéza (ITP)** umožňuje dělení analytu složeného současně buď jenom z aniontů, nebo z kationtů. V kapiláře se vzorkem je udržován konstantní proud, díky čemuž se ionty po čase seřadí podle pohyblivosti do zón, které všechny migrují stejnou rychlostí (způsobeno rozdílným napětím v zónách). Uplatňuje se tzv. samozaostřovací efekt (ionty náhodně difundující do jiných zón změny vlivem odlišného napětí svou rychlost a vrátí se do původní zóny), díky němuž jsou zóny ostře oddělené. [1] [2]

### 1.2.4. Zónová elektroforéza

Zónovou elektroforézu lze použít pro analytické i preparativní účely. Provádí se na nosičích, např. na chromatografickém papíru, ve škrobu nebo celulóze; v současnosti převážně na gelových materiálech – agarosovém, škrobovém a polyakrylamidovém gelu. Požadavky na nosiče jsou hydrofilita, nerozpustnost ve vodě a minimální schopnost adsorpce. Pórovitý gel působí jako molekulární síto, proto velikost částic analytu výrazně ovlivňuje rychlost pohybu (velké molekuly migrují pomaleji). [2]

**Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (PAGE)** je nejrozšířenější metodou zónové EF. Lze praktikovat ve sloupcovém nebo v plošném uspořádání. Sloupcová EF, probíhající v tenkých trubičkách, je starší a méně používaná, zároveň ovšem jednodušší a levnější. Plošné uspořádání je citlivější, lze snadno denzitometricky kvantifikovat, umožňuje srovnávání více vzorků na jedné desce a výsledky ve formě usušeného elektroforeogramu je

možné skladovat. Nevýhodou představuje komplikovaná příprava gelů, resp. finančně náročnější použití předpřipravených komerčních gelů. Plošnou EF lze provést horizontálně (deska s nosičem umístěná vodorovně) nebo vertikálně (deska svisle). Každé provedení je vhodné pro jiné techniky EF. Základní princip metody ilustruje Obr. 1. [2]



Obr. 1: Princip gelové elektroforézy DNA [4]

**Elektroforéza v agarosovém gelu** je standardní metodou dělení nukleových kyselin nebo vysokomolekulárních proteinů. Práce s gelem je oproti polyakrylamidovému jednodušší a méně finančně náročná, nevýhodami jsou křehkost gelu a zakalení koncentrovanějších gelů. Agarosový gel vyžaduje barvení UV citlivými interkalačními činidly, nejběžněji ethidium bromidem. [5]

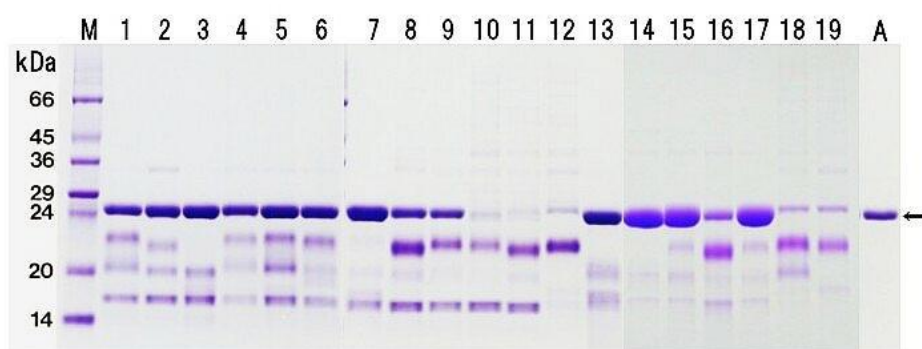
**Diskontinuální elektroforéza** řeší problém intenzivní difuze malých molekul, která znesnadňuje separaci. Do přístroje jsou umístěny dva gely s odlišnou velikostí pórů a pufrů o odlišných pH. Molekuly se po průchodu prvním, hrubším gelem seřadí a do druhého gelu s „normální“ pórovitostí vstupují ve formě velmi úzkých zón, čímž je zajištěn vyšší stupeň rozlišení molekul. [2] [3]

**Elektroforéza v gradientovém gelu** pracuje se speciálními polyakrylamidovými gely, jejichž koncentrace směrem od startu postupně narůstá (póry se zmenšují). Soubor molekul totožné velikosti v určitém místě gelu zastaví nedostatečná velikost pórů. Jako hlavní separační faktor tedy působí velikost molekul, síla elektrického pole pouze zprostředkovává pohyb molekul. [2]

**Pulzní gelová elektroforéza** na rozdíl od klasické EF dokáže účinně separovat nukleové kyseliny až se 12 miliony párů bazí. Základem metody je střídavé použití dvou nebo více elektrických polí, vzájemně orientovaných v různých úhlech. Aktivace prvního pole zahájí migraci molekul v gelu. Přepnutí na druhé pole nutí molekuly změnit směr pohybu –

čím větší molekula, tím déle změna trvá a tím pomalejší je její pohyb. Důsledkem je zpřesnění separace. [2]

**Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu s dodecylsulfátem sodným (SDS-PAGE)** je využívána při separaci bílkovin. SDS s velkým záporným nábojem se váže na bílkoviny a vyrovnává tak rozdíly v jejich nábojích a konformaci, díky čemuž je rychlost migrace ovlivněna pouze velikostí molekul. Po sestrojení kalibrační křivky je pak možné stanovovat molekulové hmotnosti neznámých proteinů. Nevýhodou SDS-PAGE je ztráta biologické aktivity bílkoviny po navázání SDS, takže např. enzymy již nelze po separaci prokázat na základě aktivity. Obr. 2 je ukázkou elektroforeogramu SDS-PAGE. [2] [3]



Obr. 2: Elektroforeogram SDS-PAGE s označením molekulových hmotností  
Vizualizace pomocí Coomassie blue. [6]

**Hanningova kontinuální elektroforéza** je beznosičová průtoková zónová EF separující molekuly v elektrolytu, který se pohybuje kolmo na směr elektrického pole. Působením pole se částice vychylují od směru toku elektrolytu pod úhlem úměrným rychlosti částice a elektrolytu. Separace probíhá v obdélníkové komoře, kde laminárně proudí elektrolyt a separované složky jsou odváděny do jímáče frakcí. [2]

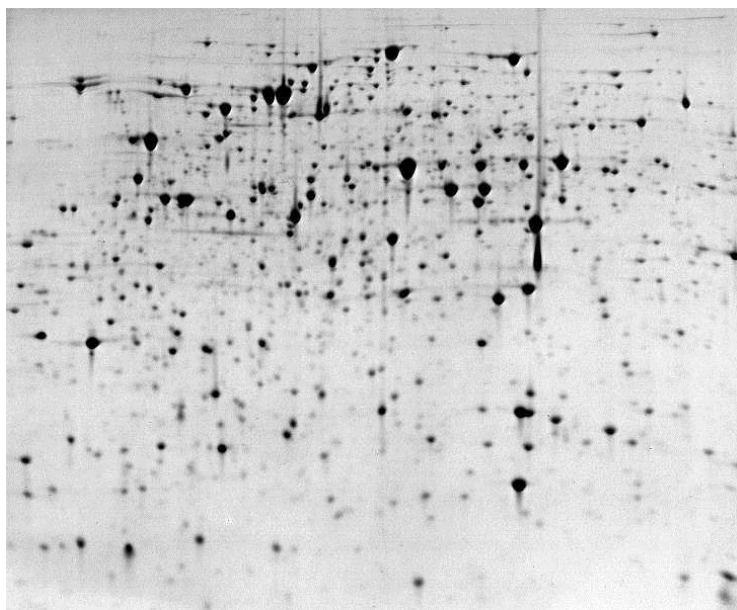
### 1.2.5. Další varianty elektroforézy

**Afinitní elektroforéza:** Provádí se v gelu s navázaným afinitním ligandem (např. barvivo nebo inhibitor enzymu). Při migraci gelem jsou pak molekuly specifické vůči ligandu navázáním zastaveny či výrazně zbrzděny, zatímco ostatní částice migrují nezměněnou rychlostí. Srovnáním výsledku s kontrolním gelem bez ligandu lze určit, který protein ze vzorku má pro ligand afinitu. Modifikacemi této metody je afinitní IEF a elektroimunodifuze. [2]

**Dvojrozměrná (2D) elektroforéza:** Pro zdokonalení separace je možno provést elektroforézu postupně ve dvou navzájem kolmých směrech. Nejčastěji se v praxi vyskytují tyto tři kombinace: PAGE v trubičce + PAGE na desce (gel se zónami z trubičky se připolymeruje



k desce a spustí se další EF), PAGE + SDS-PAGE (nejdříve separace podle náboje, pak podle velikosti), IEF v trubičce + SDS-PAGE (separace podle izoelektrického bodu, poté podle velikosti). Obr. 3 představuje typický elektroforeogram této metody. [2]



Obr. 3: Příklad výstupu 2D elektroforézy [7]

### **1.3. Použití gelové elektroforézy v praxi**

#### **1.3.1. Praktické provedení**

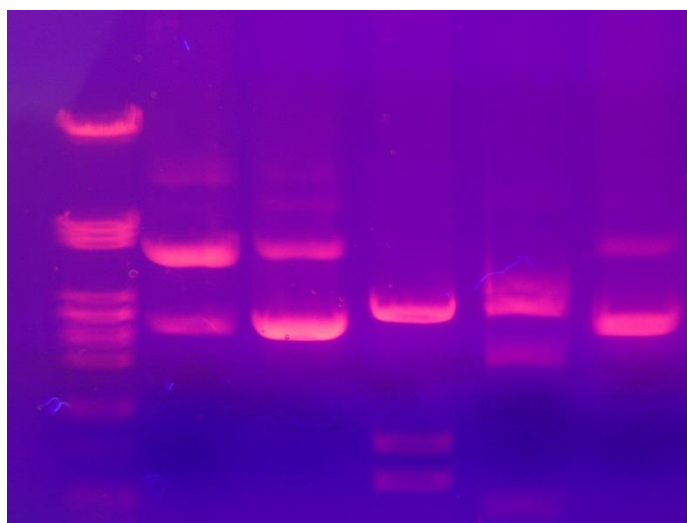
Jako příklad poslouží postup pro separaci kratších fragmentů DNA v agarosovém gelu. Nejprve se připraví gel vhodné hustoty (podle délky vyhodnocovaných fragmentů). Roztok agarosy se povaří a po ochlazení na 60 °C se nalije do elektroforetické vany v přístroji; alternativou je použití předpřipraveného komerčního gelu (pro představu: ceny asi 1000 - 30 000 Kč za 500 g podle druhu [8]). Hřebenem je u okraje gelu vytvořena řada jamek pro aplikaci vzorku. Vana se zaplní pufrům tak, aby byl celý gel ponořený, a vzorky se pipetují do jamek. Do jedné jamky je aplikován marker molekulových hmotností. Zkontroluje se správná orientace gelu a do přístroje (Obr. 4; cena asi 9 – 25 000 Kč, zdroj napětí 15 - 40 000 Kč [8]) je přivedeno napětí 120 V. Pohyb lze sledovat díky bromfenolové modři obsažené ve vzorkovém pufru. Při dosažení ideálního rozložení (po desítkách minut až hodinách) je přístroj vypnut a gel přemístěn do UV transiluminátoru (cena asi 20 - 40 000 Kč, bez kamery [8]), který osvětlením gelu zviditelní polohy separovaných fragmentů DNA různých délek a případně obraz zaznamená vestavěnou kamerou. Molekulovou hmotnost fragmentů lze pak přibližně určit srovnáním s markerem. Následovat může desorpce DNA z gelu. [9]



Obr. 4: Vana pro horizontální elektroforézu [10]

### 1.3.2. Vizualizace polohy separovaných molekul

Vizualizace slouží ke zviditelnění mnohdy bezbarvých vzorků a významně ovlivňuje konečné rozlišení separovaných látek. Nejčastěji se užívá **navázání barviva** (methylenová modř, Coomassie modř). Gel se separovanými vzorky se ponoří do barviva, poté se barvivo nenavázané na proteiny vypírá. Výsledkem jsou barevné proužky na bezbarvém gelu. Citlivější barvení stříbrem umožňuje detekovat až 0,1 ng proteinu. Molekuly prokazující **biologickou aktivitu** (typicky enzymy) lze detekovat použitím reakcí, při nichž vznikají barevné, nebo naopak odbarvené produkty. Velice citlivá **autoradiografická metoda** se uplatňuje při detekci radioaktivně značených proteinů – obraz vzniká na fotografické emulzi působením záření. Ke zviditelnění DNA slouží tzv. **interkalační činidla** (ethidium bromid (Obr. 5), proflavin, akridinová oranž), které se vmezeřují mezi páry bazí a v UV světle intenzivně fluoreskují. Moderní alternativu ethidium bromidu představují např. barviva GelRed™ a GelGreen™, která vykazují vyšší citlivost a stabilitu a nejsou mutagenní [11].

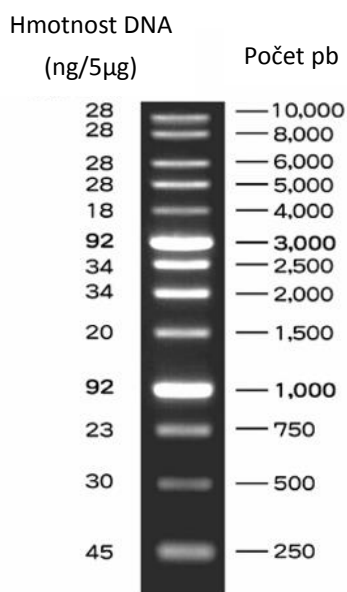


Obr. 5: Vzorek označený ethidium bromidem pod UV světlem [12]

Účinné barvení nukleových kyselin a bílkovin vyžaduje navázání látek z gelu na membránu (nitrocelulosovou, nylonovou) – jde o tzv. **blotting**, zahrnující tři varianty: Southern blotting umožňuje identifikaci DNA se specifickým pořadím bazí. Tzv. sonda se naváže pouze na DNA s určitým pořadím bazí a zviditelní ji fluorescencí. Northern blotting pracuje na podobném principu, užívá se však k detekci RNA. U obou technik lze použít i radioaktivní značení. Western blotting (imunoblotting) zviditelňuje bílkoviny na základě vazby se značenými protilátkami. [2] [3]

### 1.3.3. Vyhodnocení elektroforeogramu

Posouzení velikosti separovaných molekul se provádí pomocí standardizovaných markerů molekulových hmotností. Jedná se o komerčně dostupné směsi molekul definovaných velikostí, které se aplikují obvykle do krajní jamky a které vytvoří tzv. ladder – „žebřík“ (Obr. 6), od něhož lze porovnáním polohy odvodit velikost separovaných molekul. [9]



Ladder – 1% TAE agaróza

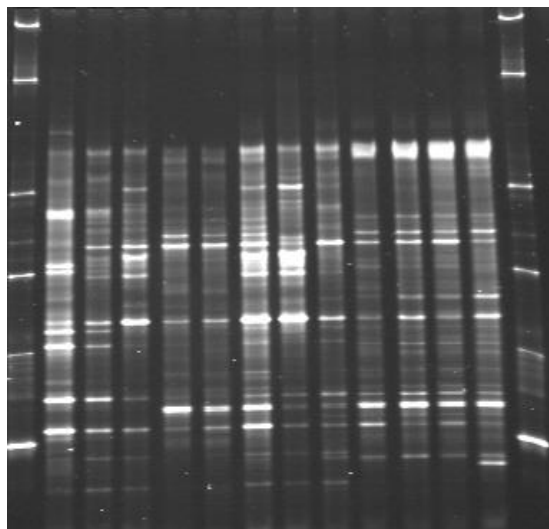
Obr. 6: DNA ladder pro 1% TAE agarózu

Vpravo počet párů bazí, kterému odpovídá proužek na gelu, vlevo hmotnost fragmentu DNA. [13]

Ladder je volen tak, aby jeho rozsah pokrýval očekávané délky molekul vzorku. Tato délka, resp. hmotnost molekul bývá vyjádřena v daltonech (Da) pro proteiny a v počtu párů bazí (pb nebo bp) pro DNA. Jeden pár bazí má hmotnost asi 650 daltonů. Často používanými rozsahy jsou 100-1000 bp a 0,5-10 kbp pro DNA a desítky až stovky kDa pro proteiny. „Stupnice“ ladderu může být logaritmická (větší rozsah) nebo lineární. [14] [15]

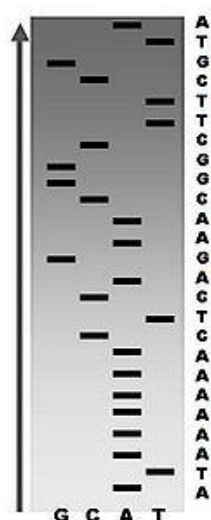
#### 1.3.4. Aplikace v mikrobiologii, genomice a proteomice

V **mikrobiologii** je elektroforéza typicky využívána při taxonomických studiích mikroorganismů. Do jamek jsou např. vkládány PCR fragmenty reprezentující jednotlivé mikroorganismy; po proběhnutí separace je na základě rozložení proužků shlukovou analýzou vyhodnocena příbuznost organismů a dle potřeby znázorněna dendrogramem, resp. fylogenetickým stromem. Obr. 7 ukazuje výsledek často používané DGGE – denaturační gradientové elektroforézy. [16]



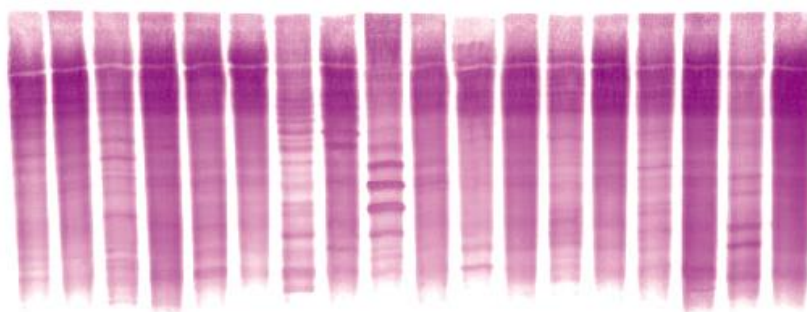
Obr. 7: Elektroforeogram DGGE [17]

**Genomika** využívá EF ke kontrole úspěšnosti štěpení či PCR, restrikčnímu mapování nebo zkoumání polymorfismu. K naposledy jmenovanému slouží metoda RFLP (restriction fragment length polymorphism) – podle počtu proužků v linii lze určit, zda jde o vzorek z homozygotního nebo heterozygotního jedince (jako příklad mohou posloužit Obr. 22 a Obr. 26 v praktické části práce). Aplikací RFLP je zjišťování pohlaví, určení otcovství a identifikace osob. Při restrikčním mapování je molekula DNA rozštěpena na menší fragmenty a jejich délka elektroforeticky analyzována. Zkombinováním zjištěných délek jsou získány informace o pozicích restrikčních míst a vytvořena tzv. restrikční mapa. Významná je Sangerova metoda, sloužící k sekvenaci DNA. Po proběhnutí příslušných reakcí a elektroforézy obsahuje gel 4 linie, v každé jsou fragmenty různých délek končící jedním nukleotidem (A, T, C, G). „Přečtením“ elektroforeogramu lze pak přesně rekonstruovat sekvenci nukleotidů vzorku (Obr. 8). [2] [4] [18]

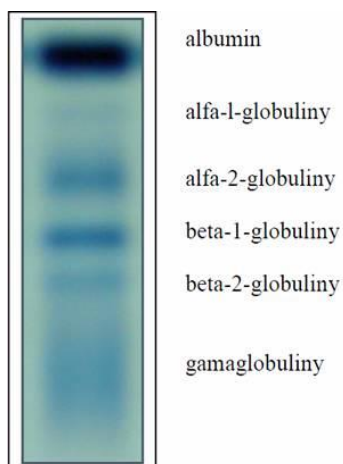


Obr. 8: Podoba gelu při použití Sangerovy metody [19]

V **proteomice** má využití především 2D elektroforéza, SDS-PAGE a izoelektrická fokusace (Obr. 9). V klinické biochemii se běžně uplatňuje elektroforéza bílkovin krevního séra. Po obarvení amidočerní jsou proužky odpovídající albuminu a globulinům v praxi denzitometricky analyzovány, díky čemuž lze odvodit jejich koncentraci ve vzorku (Obr. 10). Například zvýšená hladina alfa-1 a alfa-2 globulinu signalizuje akutní zánět a některé patologické stavy způsobují absenci složek séra. Další aplikace nachází EF ve výzkumu. [20]



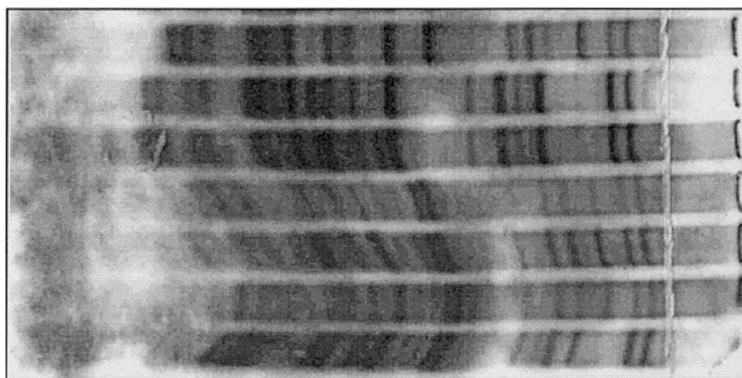
Obr. 9: Elektroforeogram izoelektrické fokusace [21]



Obr. 10: Linie gelu s popisem separovaných složek krevního séra [22]

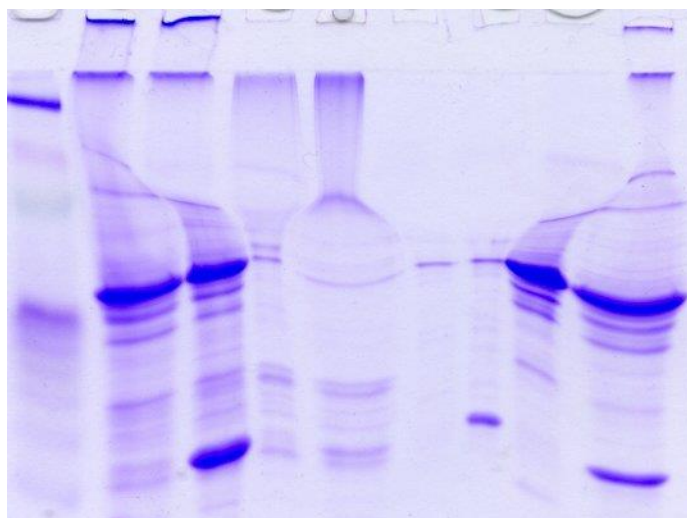
## 1.4. Zkreslení a chyby

V průběhu elektroforézy se mohou za určitých podmínek na gelu objevit chyby, které znesnadňují či znemožňují vyhodnocení elektroforeogramu a které většinou nelze odstranit dodatečnou úpravou obrazu. K nejběžnějším geometrickým zkreslením patří tzv. **smile efekt** (Obr. 11) způsobený nerovnoměrnou distribucí tepla při zapojení příliš vysokého napětí. Řešením je snížení napětí nebo přidání kovové desky pro odvod tepla.



Obr. 11: Smile efekt [23]

Zkreslení linií také bývá zapříčiněno nesprávným vytažením hřebenu z jamek, aplikací nadměrného objemu vzorku, bublinami v gelu nebo **parazitním gradientem** vzniklým nevhodným odlitím gelu. Vysoká koncentrace solí ve vzorku (tzv. **high salt**, Obr. 12) rozšiřuje a zakřivuje linie.



Obr. 12: High Salt efekt [24]

**Hyperfokusace vzorku** indikuje zapojení napětí po nedostatečně dlouhý čas. **Šum na pozadí** elektroforeogramu způsobují nečistoty přítomné v gelu. Následkem nesprávného postupu při vizualizaci může mít obraz nízký kontrast. Většině chyb lze předejít pečlivou přípravou a nastavením elektroforézy, výhodné je z tohoto hlediska použití kvalitních komerčních gelů a dalších přípravků. [16] [25]

## 2. ANALÝZA A ZPRACOVÁNÍ OBRAZŮ GELU

Využitím výpočetní techniky v procesu vyhodnocování elektroforeogramů lze zvýšit efektivitu a přesnost elektroforetických analýz. Následuje představení několika přístupů k jednotlivým krokům této problematiky a popis aplikace, testování a optimalizace těchto kroků v praktické části práce.

### 2.1. Zvýšení kvality obrazu

Základem bývá odstranění šumu prováděné filtrací, případně převod do odstínů šedi. Machado [26] využívá minimového filtru (lokální operátor ukládá do pixelu minimální hodnotu ze sousedních pixelů) – ten odstraňuje vysokofrekvenční šum, zároveň však může odstranit nevýrazné proužky. Podobné filtrace užívá i Sousa [27]. Škutková a spol. [16] zvyšují kontrast obrazu normalizací (přepočítání hodnot jasu do intervalu  $<0,1>$ ) a gamma korekcí.

### 2.2. Detekce linií

„Tradičním“ postupem je rozdělit obraz do sloupců o šířce jednoho pixelu, z každého sloupce vypočítat součet [26] [27] či standardní odchylku [28] jasu pixelů a vytvořit jasový profil obrazu – v praktické části práce označovaný jako „horizontální profil“. Nevýhodou součtu je nedostatečné zvýraznění linií s nevýraznými proužky. Standardní odchylka v mnohých případech zvýrazňuje okraje linií jasněji, proto je použita v praktické části této práce. Labyed [28] následně pracuje s první derivací odchylky, jejíž kladné píky představují začátek linie (prudký vzestup odchylky) a záporné její konec (prudký pokles odchylky). Machado [26] iterativními algoritmy postupně nachází maxima profilu. Sousa [27] profil nejprve vyhlazuje, poté detekuje extrémní ohraničující linie.

### 2.3. Detekce proužků

Po rozdělení obrazu na linie lze vytvořit profil jasu jednotlivých linií („vertikální profil“). [28] předchozí postup s úspěchem aplikuje znovu na profily linií. [27] vypočítává součet jasu pouze z úzké střední části linie, která je pro proužky reprezentativní, opět vyhlazuje profil a definuje středy proužků v podprahových minimech (při zobrazení světlé pozadí – tmavé proužky). Práh je odvozen ze standardní odchylky rozdílů mezi původním a vyhlazeným profilem. Proužek ohraničují maxima kolem jeho středu.

## 2.4. Realizace v praktické části

V průběhu vývoje a optimalizace programu bylo před dosažením uspokojivého výsledku testováno více variant algoritmů úpravy obrazu a detekce. Tato kapitola popisuje všechny významnější alternativy a odůvodňuje výběr algoritmů, které byly použity v konečné verzi programu a které jsou popsány v kap. 3.

### 2.4.1. Filtrace obrazu

Základním krokem k odstranění šumu je filtrace. Ačkoliv bylo v programu testováno více různých filtrů – Wienerův, průměrový, mediánový, minimový – s rozličnými parametry, žádný filtr uspokojivě neodstranil šum, ani nevylepšil vzhled obrazu. Obrazy se vždy jevily více či méně rozostřené, čímž mnohdy zanikly nevýrazné proužky a další detaily. Proto nebyla filtrace šumu v programu uplatněna.

Automatickou úpravou histogramu lze docílit zvýšení kontrastu. Funkce `histeq` vytvořila v obrazu výrazné oblasti s vysokým jasnem, které znemožnily další zpracování. Nepatrně lepší výsledky (nicméně stále nepoužitelné) přinesla adaptivní ekvalizace funkcí `adapthisteq`. Úprava kontrastu byla tedy zajištěna pouze normalizací jasu a gamma korekcí. Koeficient  $\gamma < 1$  by měl být použit pro podexponované snímky,  $\gamma > 1$  pro přeexponované – během testování se ukázalo, že naprostá většina snímků je přeexponovaná, proto byla použita  $\gamma > 1$ .

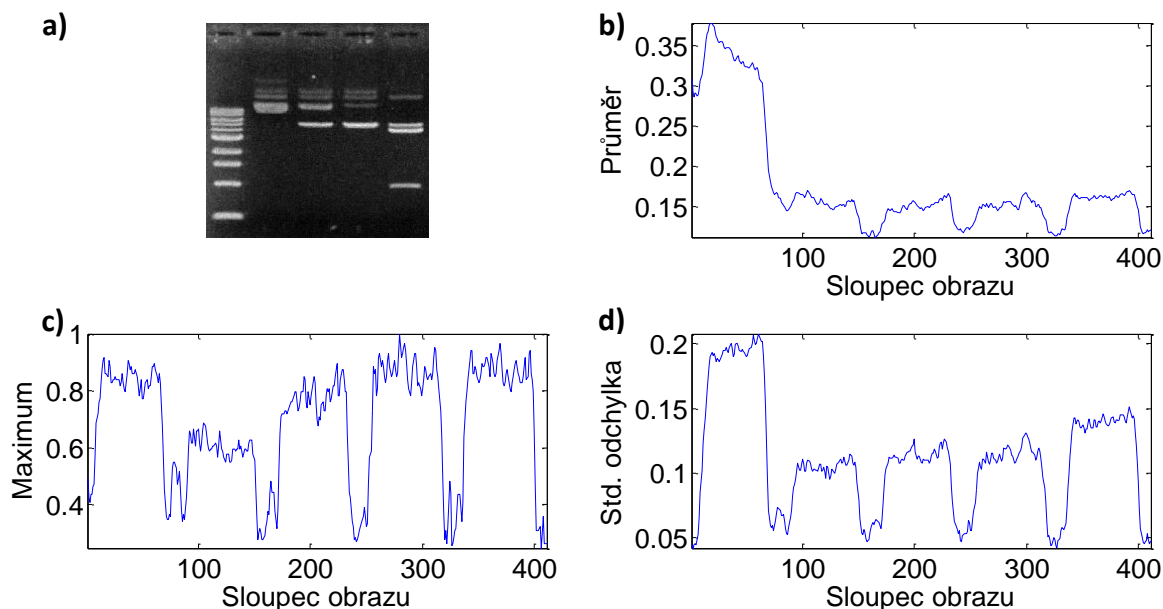
### 2.4.2. Detekce

Původní verze **detektoru linií** v jasovém profilu pracovala s pevným prahem o hodnotě např. poloviny maxima profilu, kterou mohl po vizuální kontrole ručně změnit uživatel. Tento způsob dostačoval pro obrazy s rovnými, nezkreslenými liniemi a s homogenním černým pozadím. Nebylo však možné korektně zpracovat obraz s nehomogenním pozadím, tzn. s horizontálně deformovaným průběhem profilu (Obr. 16). Proto byla testována varianta s adaptivním prahem, který by v posuvném okně hledal lokální maxima a podle nich přizpůsoboval práh. Bylo ovšem problematické definovat optimální délku okna, která by vyhovovala obrazům s různým počtem linií. V programu je použita metoda popsaná dále, která díky vyrovnaní profilu umožňuje použít jednoduchý pevný práh.

Pro zkreslené gely se jevilo jako vhodná volba rozdělení obrazu horizontálně na třetiny, v nichž by byly spočítány profily a určovány hranice linií. Průběh hranic by potom přesněji kopíroval tvar např. prohnuté linie. Způsob byl ovšem nepoužitelný pro gely obsahující např. pouze dva proužky v linii umístěné v jedné třetině obrazu (ve zbylých dvou třetinách nebyla možná detekce).



Jasový profil je vypočítán jako standardní odchylka jasů ve sloupci pixelů, neboť po vizuálním porovnání s dalšími možnostmi (suma, průměr, maximum, minimum) se jeví jako nejvhodnější – není příliš citlivá na impulzní šum, poskytuje vyrovnanější profil a výrazněji vymezuje hranice linií. Viz Obr. 13:



Obr. 13: Porovnání různých variant výpočtu horizontálního profilu  
a) zpracovávaný elektroforeogram. Profil vypočtený b) průměrem, c) maximem, d) standardní odchylkou jasů.  
(Elektroforeogram převzat z <http://www.brighthub.com/science/medical/articles/6603.aspx>)

Prvotní **detektor proužků** využíval pevný práh (0,3násobek maxima profilu linie) a umocněný profil. Při prvním překročení prahu bylo za touto pozicí vytvořeno okno, ve kterém bylo nalezeno maximum a označeno jako střed proužku. Za oknem byl opět porovnáván práh s profilem. Postup proběhl pro všechny linie. Tato metoda byla vhodná pouze pro jasné proužky a homogenní pozadí bez šumu, neboť nevýrazné proužky byly eliminovány umocněním a členitý nevyrovnaný profil vedl k mnoha falešným detekcím. Adaptivní práh nebyl použit ze stejných důvodů jako při detekci linií.

Detektor použitý v programu původně pracoval s profilem nevyhlazeným funkcí `smooth` (průměrovací filtr). Výhodou byly výraznější píky, nevýhodou větší členitost profilu, která vedla k častějším falešným detekcím. Volba délky okna filtru je kompromisem mezi příliš členitým profilem při malé délce a sléváním sousedních píků do jednoho píku při velké délce – na základě testování byla ponechána výchozí délka 5 vzorků. I pro `findpeaks` je třeba definovat detekční práh – hodnota byla experimentálně zvolena tak, aby vyhovovala co největšímu množství různých elektroforeogramů. Práh může při neuspokojivé detekci uživatel zvyšovat či snižovat tlačítky GUI.

Na rozdíl od horizontálního je vertikální profil počítán jako průměr jasu. Testování možných variant ukázalo, že pro kratší řady pixelů (např. 300 versus 30 px) je vhodnější než standardní odchylka, neboť méně zvýrazňuje šum, čímž omezuje pravděpodobnost falešných detekcí.

### 3. PROGRAMOVÉ ROZHRANÍ

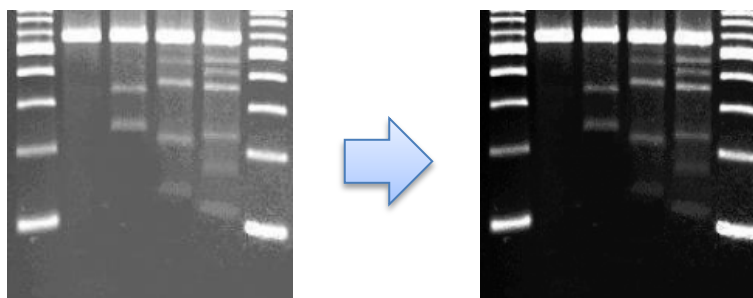
Praktická část práce popisuje vytvořený program pro zpracování elektroforeogramů a všechny jeho součásti. Program je tvořen několika dílčími funkcemi, jejichž ovládací prvky a výstupy sdružuje grafické uživatelské rozhraní (GUI), viz příloha A. Blokové schéma na Obr. 14 znázorňuje hlavní funkce programu a jejich chronologickou návaznost. Princip činnosti jednotlivých bloků popisují následující podkapitoly.



Obr. 14: Blokové schéma programu

#### 3.1. Načtení a úprava obrazu

Kliknutím na tlačítko *Vybrat obraz* je aktivována funkce *nacteni.m* (zdrojový kód v příloze 1.a). Uživatel v otevřeném dialogovém okně vybere elektroforeogram (formát např. jpeg), ten je převeden do stupňů šedi, a pokud obsahuje černé proužky na bílém pozadí (kritériem je průměrný jas větší než 0,5), je automaticky invertován. Následuje normalizace jasu (přepočet hodnot jasu do intervalu  $<0,1>$ ) a gamma korekce s koeficientem 1,5 (hodnota vyhovující pro převážnou většinu testovaných obrazů). Tyto kroky zvýší kontrast, resp. zvýrazní proužky, viz Obr. 15. Takto upravený obraz je vykreslen v GUI a připraven pro další použití.



Obr. 15: Automatická úprava kontrastu obrazu

Vlevo původní, vpravo upravený obraz.

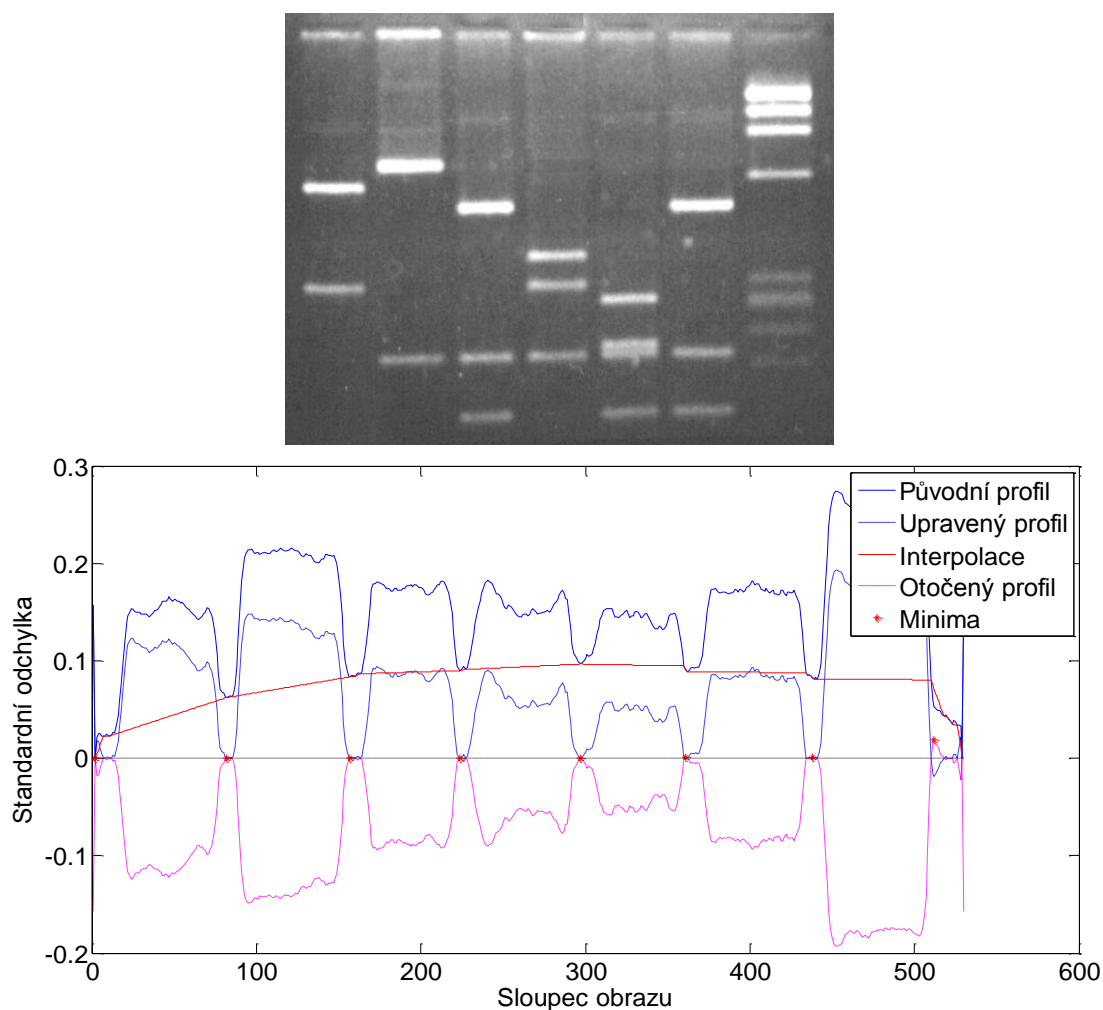
(Elektroforeogram převzat z <http://serbagunamarine.com/160-bp-long-pcr-fragment.html>)

#### 3.2. Detekce vertikálních linií

Předchozí krok zviditelní tlačítko *Detekovat linie a proužky*, které vyvolá funkci *horprof.m* (kód v příloze 1.b). Jejím vstupem je obraz gelu, z něhož funkce vypočítá „horizontální profil“

pomocí standardní odchylky způsobem popsáným v kap. 2.2. Z důvodu nehomogenního jasu pozadí některých obrazů je průběh profilu více či méně deformován, proto je vhodné ho vyrovnat tak, aby byla umožněna úspěšná detekce. K vyrovnání slouží tento algoritmus:

1. V posuvném okně konstantní délky, které prochází profilem, je nalezeno minimum a jeho poloha vzhledem k oknu i vzhledem k profilu uložena. Zároveň je uložena jeho hodnota. Délka okna odpovídá šestině šířky obrazu (na základě testování zvolena jako optimální).
2. Okno se posune o jednu hodnotu dále. Pokud se poloha aktuálního minima (vzhledem k oknu) neshoduje s polohou minima z předchozího kroku, je uložena. Tím je částečně zajištěno, že nebude uloženo několik po sobě jdoucích hodnot. Proces pokračuje do konce profilu.
3. Polohy totožných minim uložené vícekrát jsou eliminovány funkcí `unique`.
4. Funkcí `interp1` je minima proložena křivka a odečtena od profilu. Tím je profil vyrovnán. Viz Obr. 16.

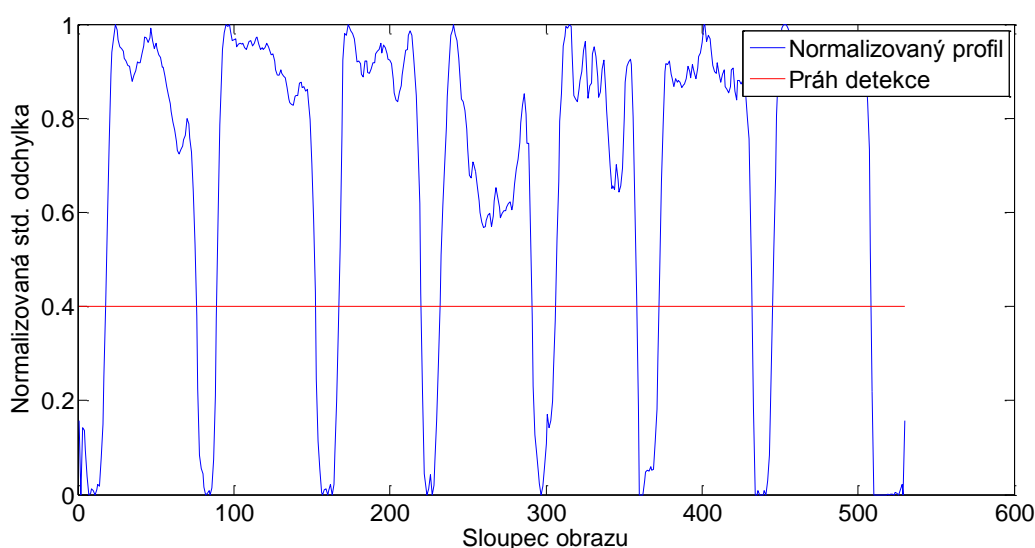


**Obr. 16: Úprava jasového profilu obrazu gelu s nehomogenním pozadím**  
**Nahoře původní obraz, dole vyrovnání jeho horizontálního profilu.**  
 (Elektroforeogram převzat z [http://www.mun.ca/biology/scarr/Gel\\_Electrophoresis.html](http://www.mun.ca/biology/scarr/Gel_Electrophoresis.html))

Dále jsou výšky „píků“ označujících linie normalizovány, aby bylo možné použít jednoduchou detekci hranic linií:

1. Profil je otočen kolem osy y a funkcí `findpeaks` nalezeny píky, jejichž polohy odpovídají minimům, která ohraničují píky linií.
2. Každá oblast mezi minimy (tzn. pík linie) je normalizována tak, že maximum je přepočítáno na hodnotu 1, minimum na 0 a ostatní hodnoty spadají mezi 0 a 1.
3. Nyní mají všechny píky stejnou výšku, proto může být nastaven pevný práh ( $p=0,5$ ) a provedena detekce linií. Jako levá hranice (začátek) linie je uložena první nadprahová hodnota, jako pravá hranice (konec) poslední nadprahová hodnota.
4. Falešné detekce většinou způsobené výraznějším impulzním rušením, tzn. „linie“ s velmi malou šířkou, jsou vymazány. Podmínkou pro vymazání je šířka linie menší než polovina mediánu šířek všech detekovaných linií.

Konečná forma profilu je na Obr. 17. Výstup funkce představují polohy hranic linií a počet linií.

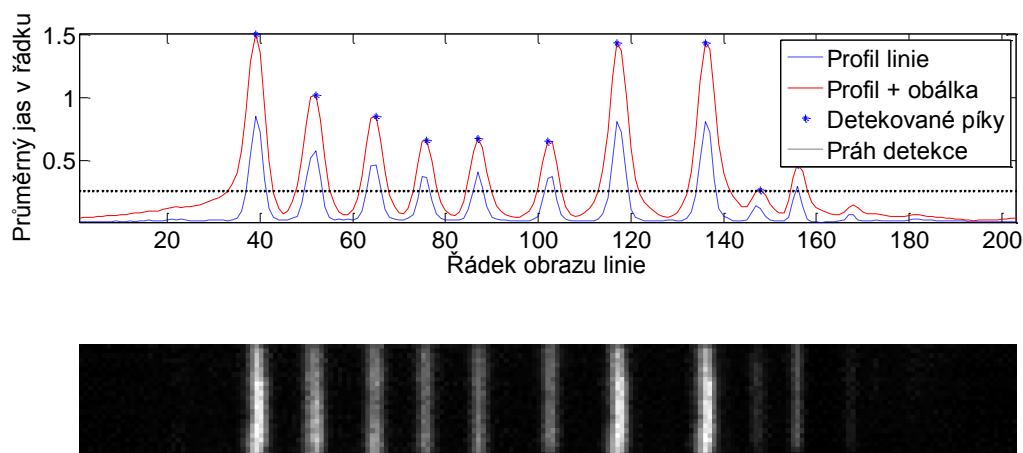


Obr. 17: Normalizovaný horizontální profil elektroforeogramu z Obr. 16

### 3.3. Detekce horizontálních proužků

Na detekci linií bezprostředně navazuje *vertprof.m* (kód v příloze 1.c), funkce pro detekci proužků v liniích, která přebírá výstup předchozí funkce. Z každého řádku pixelů v rámci hranic linie je vypočítán průměr; průměry všech řádků tvoří vertikální profil linie. Pro zvýraznění píků je profil sečten se svoji obálkou (vytvořena funkcí `hilbert`), tento součet je vyhlazen funkcí `smooth` (průměrovací filtr). Postup je aplikován na všechny linie a slouží i k odfiltrování šumu. Píky značící světlý proužek jsou nalezeny matlabovskou funkcí

`findpeaks`, jejíž detekční práh je definován jako 0,3násobek maxima profilu. Detekci ilustruje Obr. 18. Následuje vykreslení hranic linií a značek proužků do obrazu gelu pomocí funkce `vykreslit.m` (kód v příloze 1.e). Při nenalezení všech proužků, resp. při falešných detekcích může uživatel práh snížit, resp. zvýšit tlačítky Upravit citlivost detekce. Pokud by ani tehdy neproběhla 100% správná detekce, lze značky proužků přidat či odebrat ručním označením v obrazu gelu.



Obr. 18: Detekce proužků v linii  
Nahoře vertikální profil linie, dole obraz odpovídající linie.

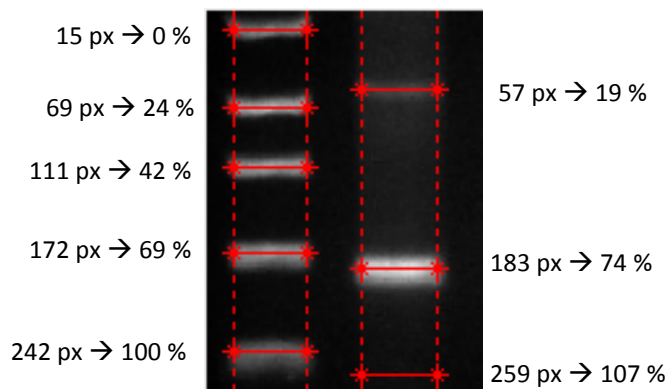
### 3.4. Výpočet molekulárních hmotností vzorků

Pro výpočet hmotností vzorků v gelu je nejprve třeba definovat molekulární hmotnosti ladderu. Stisk tlačítka *Ladder - Z obrazu* vybere první linii zleva jako referenční ladder. Nyní uživatel přepínačem zvolí jednotky (bp nebo kDa) a do textového pole vyplní hmotnosti ladderu, od nejvyšší po nejnižší. Vyplněné hodnoty se automaticky přiřadí k polohám vzorků ladderu a pro názornost jsou i takto zobrazeny. Pokud uživatel často pracuje s jedním typem ladderu, má možnost ladder se zadanými hodnotami exportovat z Matlabu. Při analýze dalších elektroforeogramů jej stačí pouze načíst, čímž je eliminováno časově náročnější ruční zadávání hodnot. Ladder je uložen jako soubor proměnných ve formátu `mat`.

Dalším krokem je výpočet molekulárních hmotností všech vzorků podle ladderu. Tlačítko *Zobrazit mol. hmotnosti* spustí následující algoritmus (funkce `hmotnosti.m`, kód v příloze 1.d):

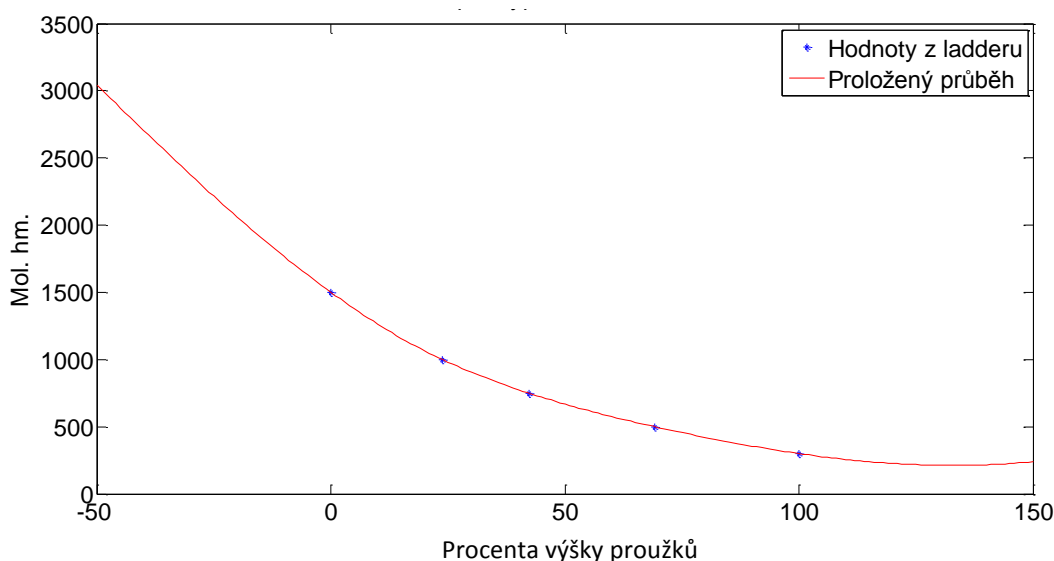
1. Polohy proužků ladderu v pixelech jsou normalizovány na procenta výšky linie (první a poslední poloha tvoří hranice intervalu  $<0\%, 100\%>$ , ostatní polohy náleží do tohoto intervalu).

2. Polohy v dalších liniích jsou normalizovány analogicky, poloha hranic 0 % a 100 % je však stále odvozována z linie ladderu – díky tomu lze srovnávat polohy vzorků s ladderem. Princip přepočtu ilustruje Obr. 19:



**Obr. 19: Normalizace poloh vzorků v obrazu**  
Vlevo polohy ladderu, vpravo polohy vzorků s výškou odvozenou z ladderu. Výška obrázku je 272 px. Výška sloupce v % je brána odshora dolů.

3. K vypočtení molekulových hmotností vzorků je třeba znát závislost mezi polohou vzorku a jeho hmotností. Průběhu závislosti se lze přiblížit proložením křivky několika pomyslnými body ladderu (souřadnice  $x$  = normalizovaná výška,  $y$  = odpovídající zadaná hmotnost) pomocí funkce `interp1`. Interpolací kubickým polynomem jsou vypočítány molekulární hmotnosti všech detekovaných vzorků s relativně velkou přesností. Možná je i extrapolace (v Obr. 19 pro polohu „107 %“), u které však již nelze zaručit vysokou přesnost, zvláště u odlehlejších poloh. Průběh pro ladder z Obr. 19 je znázorněn na Obr. 20.
4. Vypočtené hmotnosti jsou uloženy a zobrazeny v tabulce.



**Obr. 20: Interpolovaný průběh závislosti molekulové hmotnosti na normalizované výšce proužků**

### 3.5. Další funkce programu

Kromě popsaných funkcí je program vybaven dalšími doplňkovými prvky, které by při případném používání programu v praxi mohly zvýšit jeho užitečnost a uživatelskou přívětivost:

- **RESET:** tlačítko pro znovuspuštění programu (není nutné program zavírat a opětovně otevírat).
- **Hmotnosti v obraze:** kromě tabulky mohou být hmotnosti pro větší přehlednost vypsané přímo na pozice proužků do obrazu gelu; ukázka v příloze B.
- **Export hmotností do xls:** vypočtené hmotnosti vzorků mohou být uloženy do samostatné tabulky programu MS Excel. Ta kromě tabulky hmotností obsahuje ještě hmotnostní jednotky a umístění a název zpracovaného obrazu. Ukázka exportované tabulky je v příloze B.
- **Uložit aktuální obraz:** umožňuje uložit aktuální podobu obrazu v jakékoliv fázi zpracování.
- **Vykreslit původní obraz:** v novém okně zobrazí původní obraz bez úprav.
- **Vykreslit upravený obraz:** v novém okně zobrazí upravený elektroforeogram vzniklý převodem 1D vertikálních profilů linií do 2D obrazu; ukázka v příloze D.
- **Vykreslit binární obraz:** v novém okně vytvoří „binární“ obraz (obsahuje pouze dvě intenzity jasu). Ten má rozměry obrazu gelu, pozadí je homogenní černé (int. jasu 0), v místech detekovaných proužků je bílá (int. jasu 1) – jedná se o zjednodušený, idealizovaný a schematický obraz elektroforeogramu; ukázka Obr. 24.
- Zvětšení části aktuálního obrazu pro kontrolu detailů nebo pro přesnější označení nedetekovaného proužku.
- Zobrazení názvu aktuálního elektroforeogramu a jeho umístění na disku. Zobrazení názvu uloženého ladderu.
- Ukládání obrazů, ladderů a tabulek MS Excel pod libovolným názvem, který zadá uživatel.

Obrázek uživatelského rozhraní se všemi prvky obsahuje příloha A.

Kompletní zdrojový kód dílčích funkcí programu se nachází v příloze E.

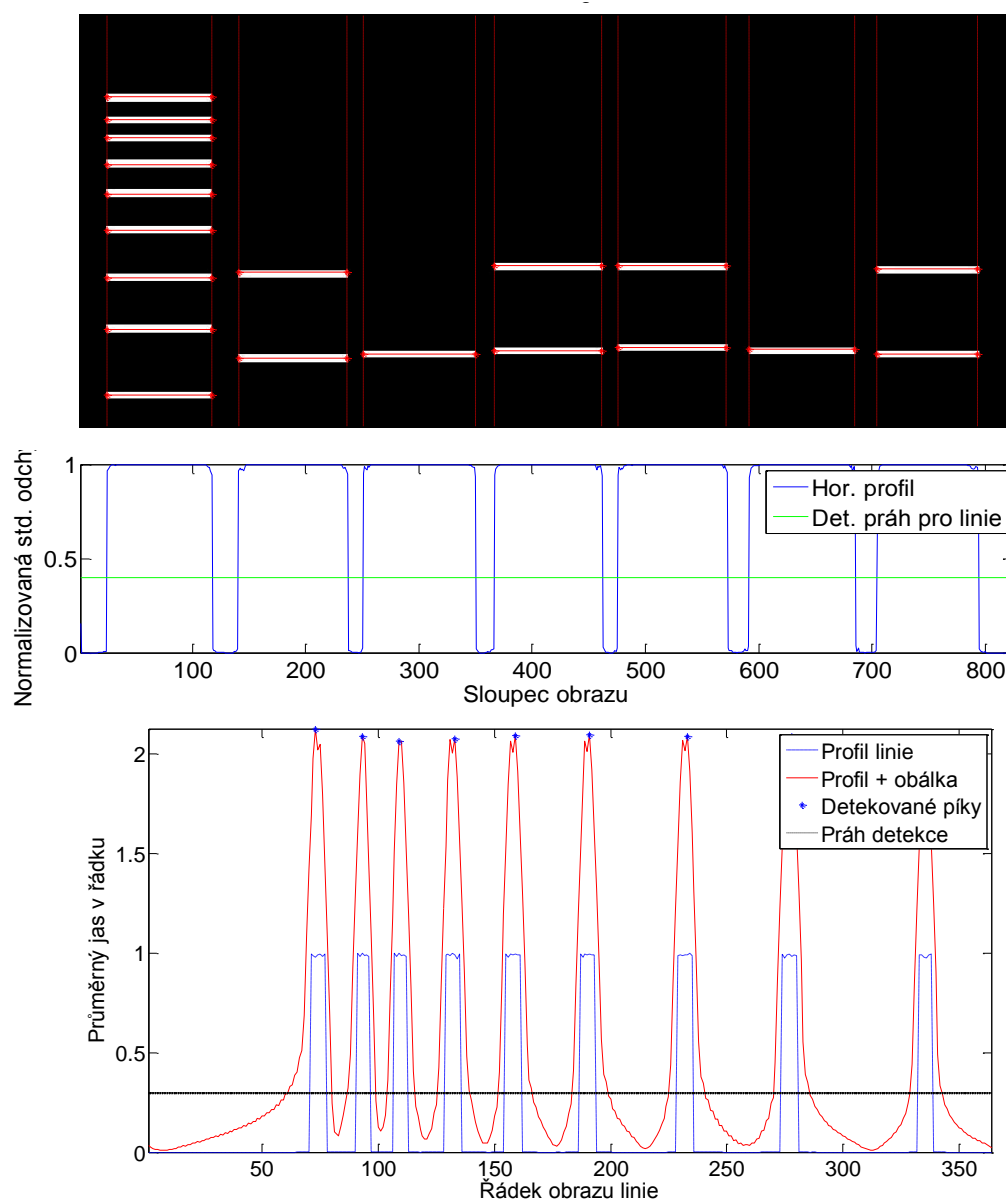


## 4. TESTOVÁNÍ ÚČINNOSTI PROGRAMU

Kapitola představuje na vybraných obrazech funkčnost programu a demonstruje robustnost navržených algoritmů detekce proti různým typům zkreslení. Pozn.: v obrázcích jsou horizontální profily vždy zarovnány pod elektroforeogramem tak, aby píky svou polohou odpovídaly poloze linií v obraze.

### 4.1. Ideál – binární obraz

Prvním testovacím snímkem je binární elektroforeogram vytvořený v programu, složený pouze z minimální a maximální hodnoty jasu:



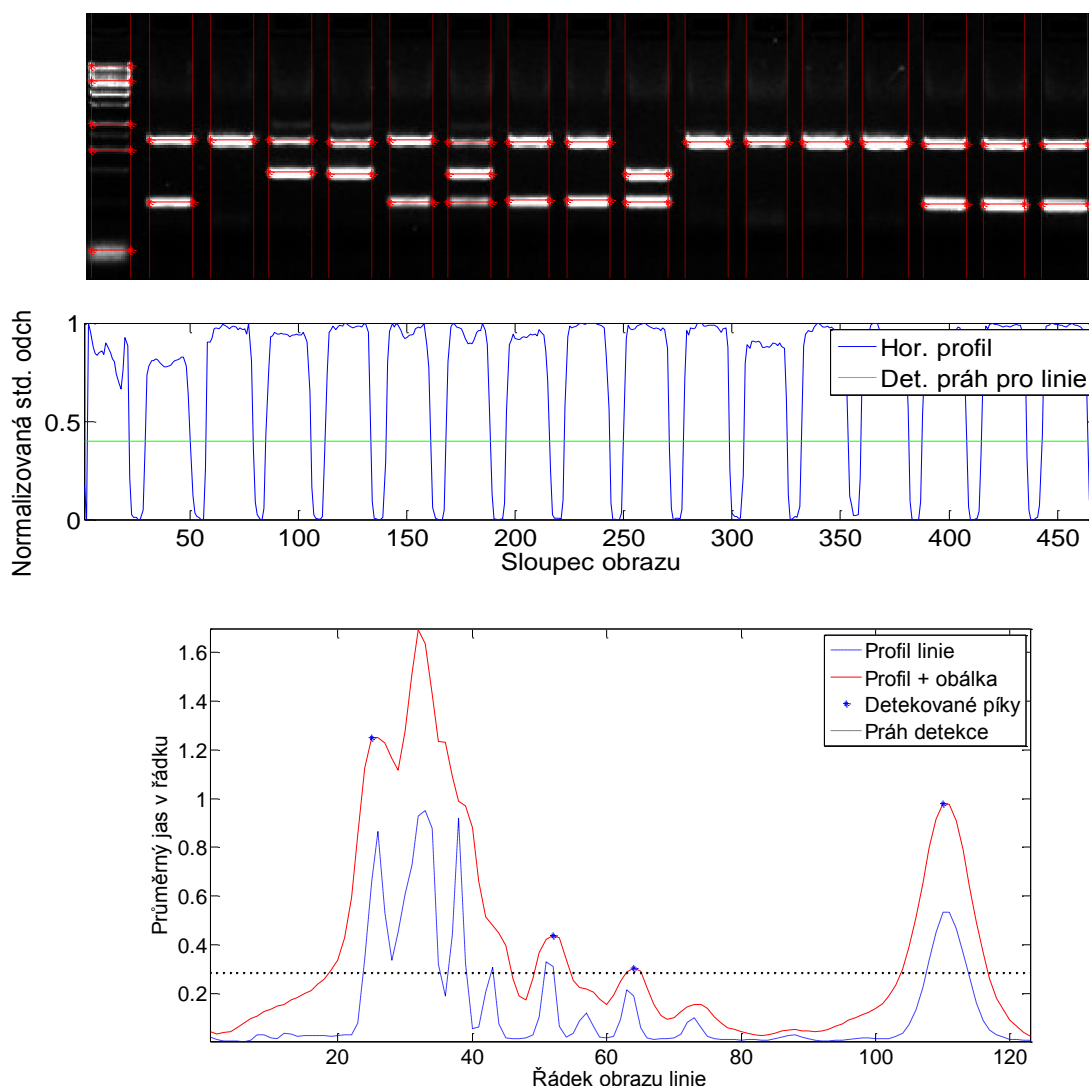
Obr. 21: Analýza binárního obrazu

Nahoře binární obraz, uprostřed jeho normalizovaný horizontální profil, dole vertikální profil linie ladderu.

Program bez problémů detekoval všechny linie a proužky. Ideální ploché vrcholy vertikálního profilu u některých proužků paradoxně zpřesnily označení středu proužku, neboť byly detekovány menší píky na okrajích vrcholu hlavního píku. Obr. 21 může sloužit pro srovnání s následujícími snímky a jejich profily.

## 4.2. Žádné zkreslení

Druhým snímkem je elektroforeogram s jasnými proužky (kromě ladderu, který není příliš zřetelný), rovnými liniemi a relativně homogenním pozadím:



**Obr. 22: Analýza obrazu bez zkreslení**

Nahoře původní snímek, uprostřed jeho normalizovaný horizontální profil, dole vertikální profil linie ladderu.  
(Elektroforeogram převzat

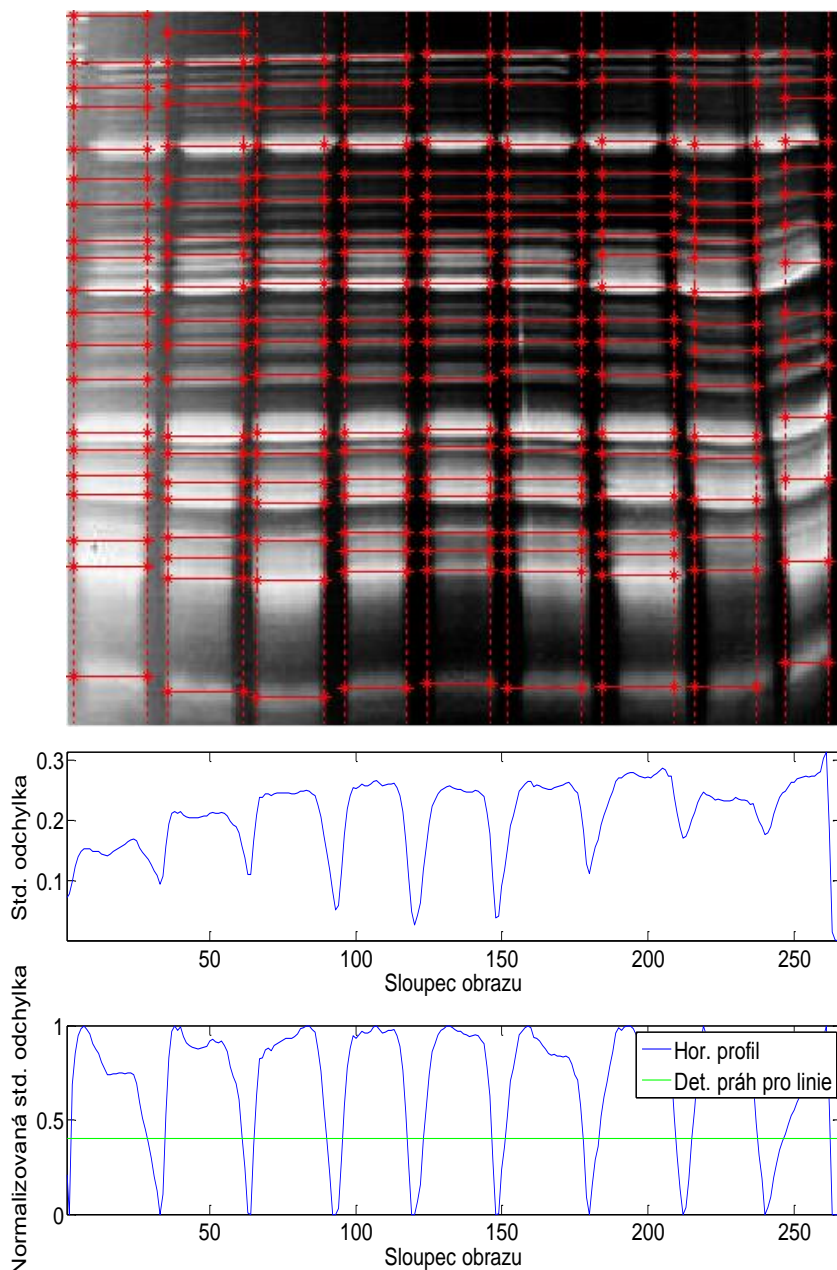
z <http://www.6mgel.com/bufferless%20mouse%20genotyping%20gel%20by%20rapid%20equipment.jpg>)

Linie byly detekovány bezchybně, všechny proužky kromě ladderu také. Z profilu ladderu je patrné, že vyhlazení a sečtení profilu s obálkou eliminovalo pík třetího a čtvrtého

proužku. Tyto proužky je třeba ručně označit, ostatní málo výrazné proužky budou detekovány po ruční změně citlivosti.

### 4.3. Běžné zkreslení – zakřivené linie

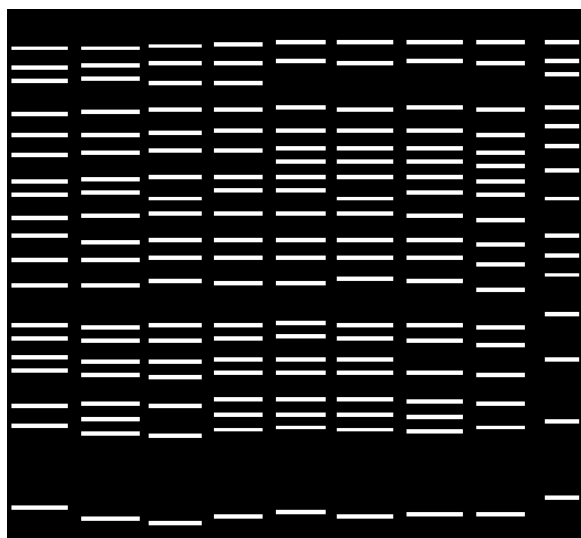
Obraz obsahuje mnoho proužků, zde však slouží především pro testování detekce zakřivených, resp. prolnutých linií. Střední linie jsou rovné, další linie se směrem k okrajům více a více zakřivují. Pozadí je spíše nehomogenní.



Obr. 23: Analýza obrazu se zakřivenými liniemi

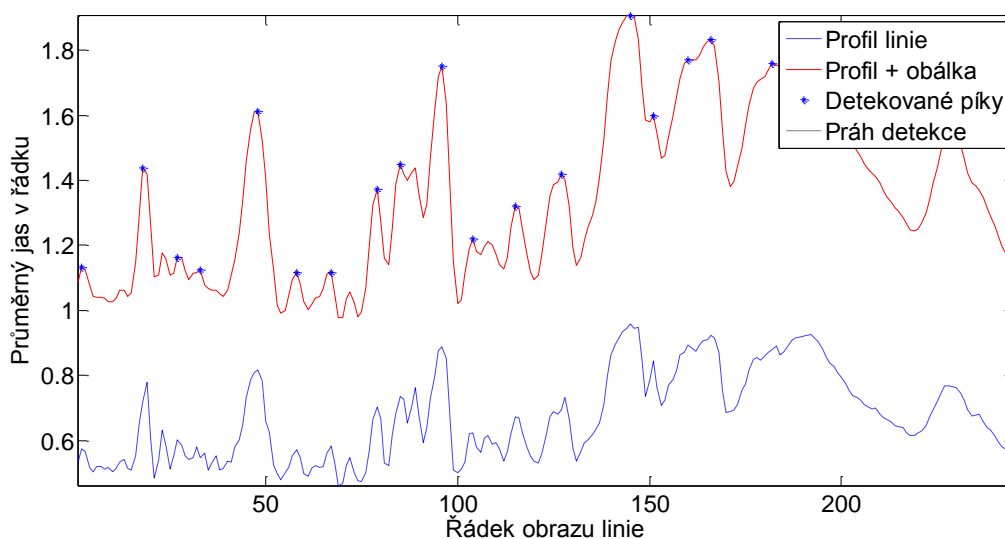
Nahoře původní snímek, uprostřed jeho horizontální profil, dole normalizovaný horizontální profil.  
(Elektroforeogram převzat z <https://www.agronomy.org/images/publications/cs/52/4/1786fig2.jpeg>)

Snímek má kvůli zakřivení linií poměrně nepravidelný průběh horizontálního profilu a hranice jsou určeny tak, že odpovídají jasnějším a rovnějším spodním částem linií. V horní části již proužky spadají do hranic pouze částečně; nejzřetelněji „vybočují“ dvě krajní linie vpravo. Přesto jsou detekovány i proužky, které do linie spadají pouze částečně. Algoritmus detekce je tedy proti takto zakřiveným liniím odolný. V tomto případě by mohlo být užitečné z označených pozic vygenerovat binární obraz, který by obsahoval „narovnané“ linie – pro ilustraci Obr. 24:



Obr. 24: Binární obraz elektroforeogramu

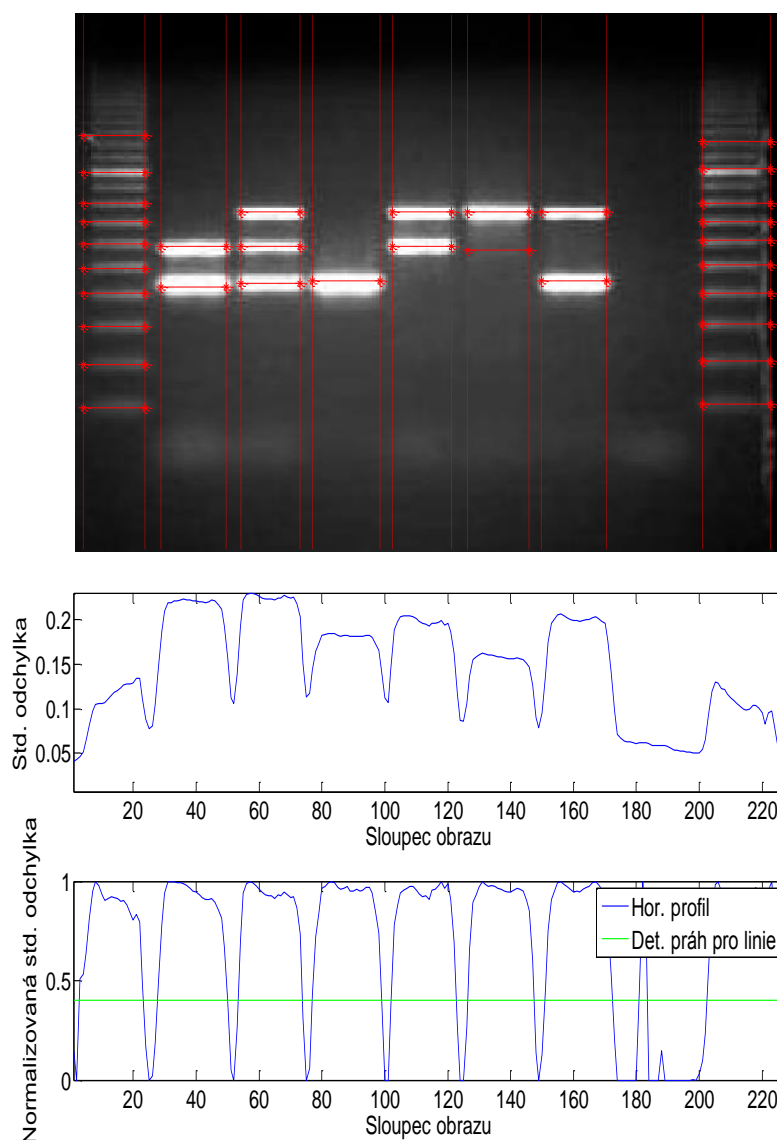
Většina proužků byla označena korektně. U jasných spodních proužků není možno ani po podrobnějším prozkoumání rozhodnout, zda jde o jeden či více proužků, proto zde příliš nelze posoudit úspěšnost detekce. Na Obr. 25 je zobrazen vertikální profil první linie zleva (původního elektroforeogramu z Obr. 23):



Obr. 25: Vertikální profil první linie zleva elektroforeogramu z Obr. 23

#### 4.4. Běžné zkreslení – nehomogenní pozadí

Snímek se vyznačuje nehomogenním pozadím. Další „zvláštností“ je chybějící linie v pravé části. Jasné proužky jsou dobře viditelné i na světlejším pozadí. Proužky ladderu v horní části zcela splývají.



**Obr. 26: Analýza obrazu s nehomogenním pozadím**

**Nahoře původní snímek, uprostřed jeho horizontální profil, dole normalizovaný horizontální profil.**

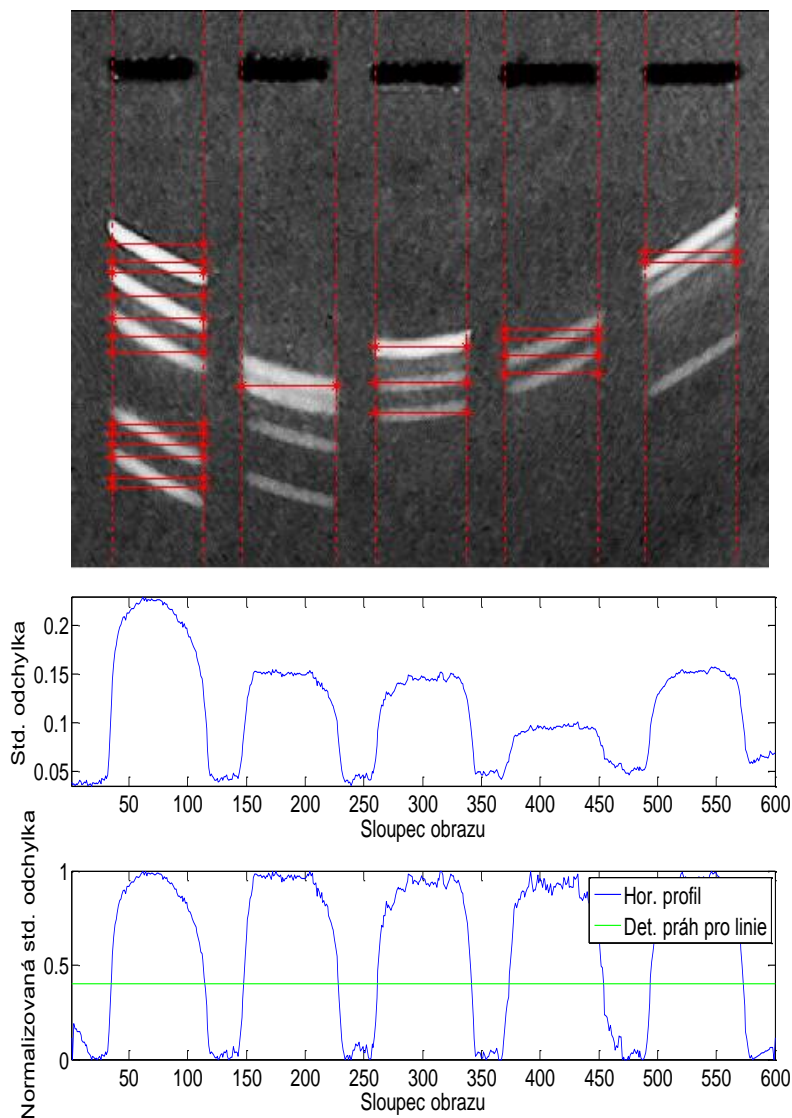
(Elektroforeogram převzat z <http://caribbean.scielo.org/img/revistas/wimj/v59n6/a02fig01.jpg>)

V tomto případě je nezbytností normalizace profilu, který je deformovaný vlivem nehomogenního pozadí. Normalizace umožní úspěšnou detekci všech linií; na místě chybějící linie vznikl falešný pík, který však kvůli malé šířce není označen jako linie. Vznik tohoto píku je důsledkem proložení a odečtení interpolační křivky, která přesně nekopíruje profil „mezery“, následkem čehož se vytvoří malé píky, které jsou potom identifikovány jako hranice linií, mezi nimiž má proběhnout normalizace. Jasné proužky jsou detekovány, vlivem

světlejšího pozadí však vzniklo i několik falešných detekcí, které byly odstraněny ruční úpravou citlivosti detektoru. Splývající a málo jasné proužky v horní části ladderu nebyly detekovány.

#### 4.5. Silné zkreslení – smile efekt a šum

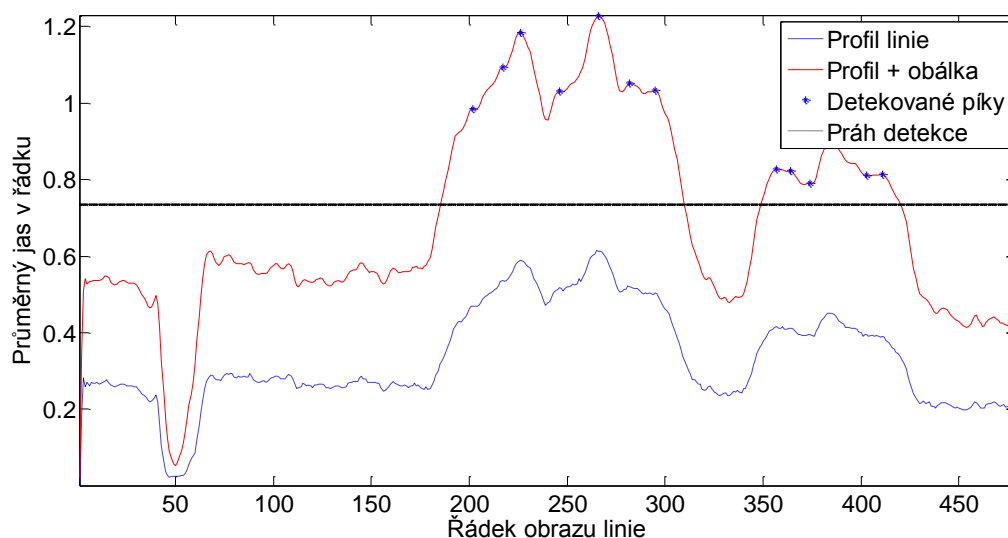
Snímek se vyznačuje smile efektem a vysokou mírou šumu pozadí, v jehož důsledku lze očekávat zhoršenou schopnost detekce proužků.



**Obr. 27: Analýza obrazu zkresleného „smile efektem“ a znehodnoceného šumem**  
**Nahoře jeho horizontální profil, dole normalizovaný horizontální profil.**

(Elektroforeogram převzat z [http://learning.covcollege.ac.uk/content/Jorum/GMB\\_DNA-electrophoresis\\_LM-1.2-29Jan08/page20.htm](http://learning.covcollege.ac.uk/content/Jorum/GMB_DNA-electrophoresis_LM-1.2-29Jan08/page20.htm))

Jelikož rovný tvar linií byl zachován, lze účinně normalizovat profil a detekovat linie - přinejmenším v tomto případě tedy smile efekt na detekci linií nemá vliv.

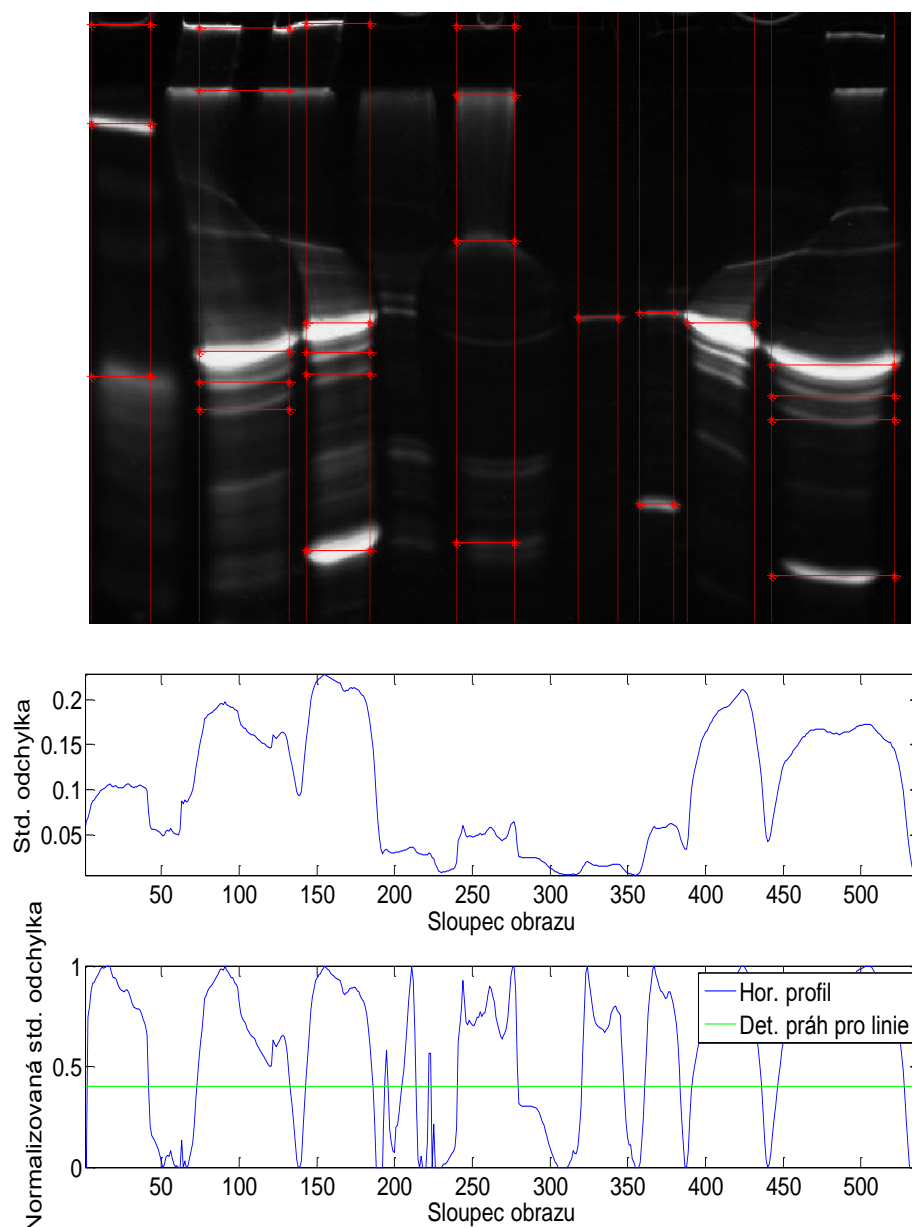


Obr. 28: Vertikální profil první linie zleva elektroforeogramu z Obr. 27

Vertikální profil (Obr. 28) díky šumu a šikmým proužkům nemá typický průběh, který by byl detektor schopen zpracovat. I v případě úspěšné detekce proužků (např. jejich středů) by však nemělo smysl pokračovat výpočtem molekulárních hmotností vzorků, neboť ty vlivem smíle efektu migrují dále než do očekávané oblasti, čímž jejich poloha přestává vypovídat o hmotnosti. Šum zapříčinil falešné detekce, které byly odstraněny ručním zvýšením prahu detektoru, a zároveň znemožnil detekci méně jasných proužků.

#### 4.6. Silné zkreslení – high salt efekt

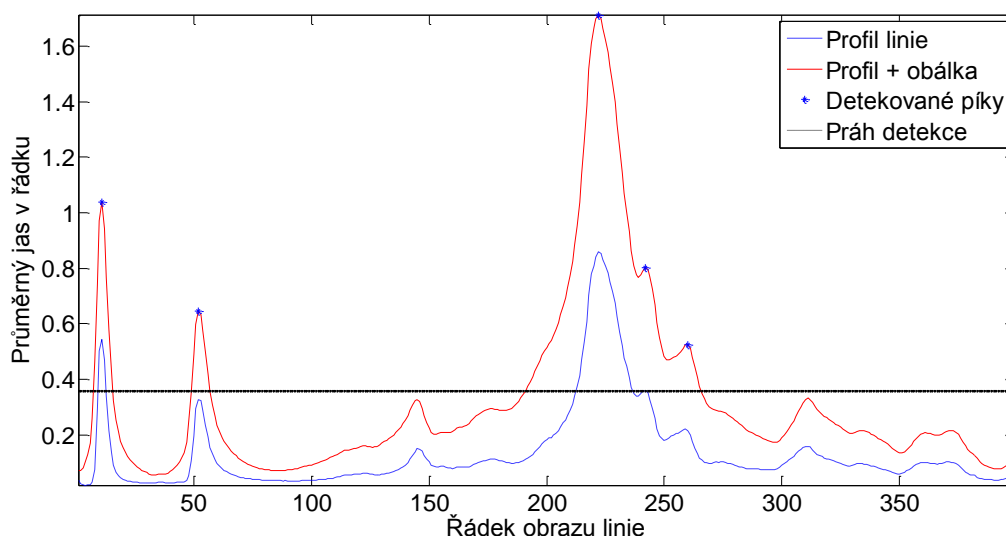
Snímek (Obr. 29 na následující straně) je velmi silně zkreslen high salt efektem, nelze tedy očekávat korektní detekci. V praxi by tento snímek pravděpodobně nebyl vyhodnocován a elektroforéza by se opakovala. Jeho původní podoba je na Obr. 12 v teoretické části práce.



**Obr. 29: Analýza obrazu silně zkresleného high salt efektem**  
**Nahoře původní snímek, uprostřed jeho horizontální profil, dole normalizovaný horizontální profil.**  
 (Elektroforeogram převzat z [24])

Horizontální profil má velmi nevyrovnaný průběh, zvláště prostřední čtyři linie téměř nejsou patrné. Normalizace profil významně vylepší – většina linií je úspěšně zvýrazněna, což dokazuje, že algoritmus je poměrně robustní proti zkreslením vyznačujícím se nevyrovnaným jasovým profilem. Pouze pík čtvrté linie zleva je nesprávně rozdělen na tři menší píky, které kvůli své malé šířce nejsou při detekci označeny jako linie.



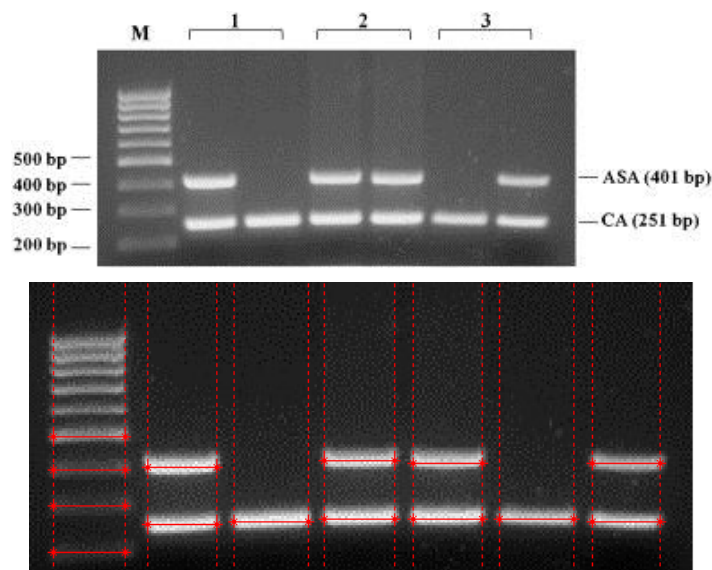


**Obr. 30: Vertikální profil druhé linie zleva elektroforeogramu z Obr. 29**

Většina proužků je zakřivená, detekce jasnějších proužků (nebo jejich částí) však probíhá úspěšně. Na Obr. 30 je zachycen průběh vertikálního profilu druhé linie zleva původního elektroforeogramu z Obr. 29.

#### 4.7. Výpočet molekulových hmotností

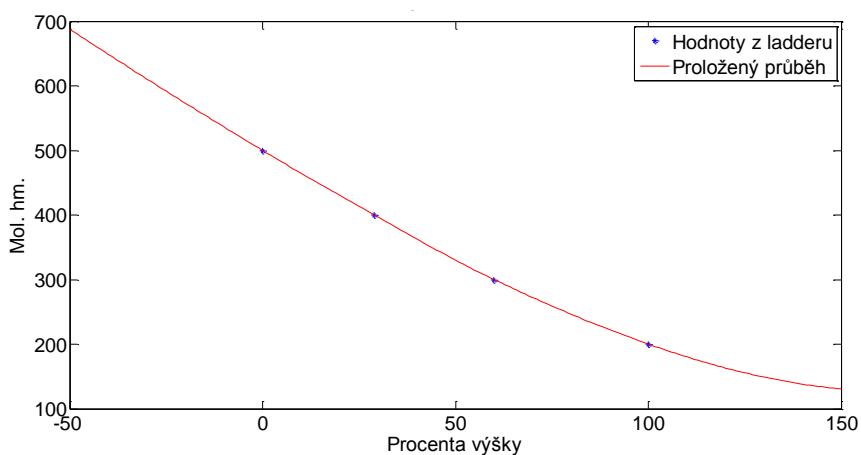
Pro ověření výpočtu molekulových hmotností byl vybrán snímek s definovaným ladderem a označenými hmotnostmi, které budou použity pro srovnání:



**Obr. 31: Elektroforeogram s označenými hmotnostmi vzorků a jeho upravená podoba s detekovanými proužky**  
**Nahoře původní snímek, dole snímek po úpravě a detekci.**

(Elektroforeogram převzat z <http://respiratory-research.com/content/9/1/55/figure/F7>)

Snímek obsahuje ladder s definovanou pouze spodní částí, proto bylo třeba pro správnou funkci algoritmu označení ostatních proužků ručně odebrat (jak je zřejmé z Obr. 31).



Mol. hmotnosti vzorků		[bp]				
1. linie	2. linie	3. linie	4. linie	5. linie	6. linie	7. linie
500	407		430	422		422
400	258	264	269	269	269	264
300						
200						

Ref.:  
401  
251

Obr. 32: Výpočet molekulárních hmotností vzorků  
Nahoře funkce pro výpočet hmotností, dole tabulka vypočítaných hmotností.

V tabulce na Obr. 32 jsou zaznamenány vypočtené hmotnosti, které se od referenčních liší o jednotky až desítky bp - minimální rozdíl je 6 bp, maximální 29 bp. Proložení bodů ladderu v grafu a následná interpolace jsou přesné, rozdíly do procesu vnášejí vlastnosti snímku. Velkou měrou se projevuje smile efekt, který je nejsilnější ve středu obrazu, kde se i hmotnosti nejvíce liší od referenčních. Vliv má menší rozlišení snímku (260x115 px), v jehož důsledku diskrétní intervaly označených pozic mezi proužky ladderu (dané řádky pixelů) musí být odstupňovány hruběji – konkrétně: rozdíl mezi proužky „500 bp“ a „100 bp“ v ladderu je asi 45 px, tzn. 45 možných poloh značek, mezi které se „rozmístí“ rozsah hmotností 400 bp, čímž je dána přesnost přibližně 9 bp (liší se podle rozdílných rozestupů jednotlivých proužků). Přesnost platí pouze pro tento obraz; s vyšším rozlišením a většími vzdálenostmi mezi proužky ladderu se zvyšuje. Dalšími významnými faktory jsou rozlišovací schopnost gelu, použití vhodného ladderu a preciznost elektroforetického procesu. Pro zaručení maximální přesnosti by tedy obraz neměl být zkreslený a mít větší rozlišení a co největší rozestupy mezi proužky ladderu.

# ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo vytvořit program, který umožní detekci proužků v kvalitních i zkreslených obrazech gelu a vypočítá molekulární hmotnosti vzorků. Testování vytvořeného programu na snímcích gelu rozdílné kvality prokázalo jeho funkčnost a odolnost algoritmu detekce linií proti různým typům zkreslení.

Nejúspěšněji pochopitelně probíhá detekce v kvalitních obrazech bez zkreslení, velmi dobré výsledky přináší i analýza mírně zkreslených obrazů (prolnuté linie, nehomogenní pozadí, apod.), které se často vyskytují v praxi. V takových případech lze program účinně využít pro „vylepšení“ obrazu generováním nového elektroforeogramu na základě dat získaných detekcí. Tímto způsobem je možné například vyrovnat prolnuté linie či odstranit šum. Za uspokojivou lze označit detekci i v obrazech se silným zkreslením (např. high salt efekt), nicméně takto nekvalitní obrazy by v praxi pravděpodobně ani nebyly analyzovány, protože zkreslení zde naprosto znehodnotí výsledek. Slouží tedy pouze pro demonstraci robustnosti algoritmů.

Realizované automatické stanovení molekulárních hmotností vzorků na základě hmotnostního markeru (ladderu) v obrazu je mnohem přesnější než běžně používaný subjektivní odhad uživatele. Přesnost určení hmotností závisí především na dostatečném rozlišení obrazu, použití vhodného ladderu, rozlišovací schopnosti gelu a míře zkreslení (platí zvláště pro „smile efekt“).

Program je navržen tak, aby mohl být případně využit i v praxi. Obsahuje jednoduše ovladatelné a přehledné grafické uživatelské rozhraní a doplňkové funkce pro usnadnění práce – např. možnost uložení často používaných ladderů, export vypočtených hmotností do MS Excel nebo zobrazení elektroforeogramů v různých podobách. Automatickou detekci proužků doplňuje možnost změny její citlivosti a manuálního označování nedetekovaných nebo odebírání falešně detekovaných proužků, což značně zlepšuje využitelnost programu.

Nahrazení „ručního“ vizuálního vyhodnocení elektroforeogramů zautomatizovanou analýzou pomocí programu nabízí výhodu výrazného urychlení procesu, zpřesnění výsledků a možnosti ukládání výstupů v několika podobách. Algoritmy detekce byly optimalizovány pro použití na různých typech snímků gelů, lišících se například v počtu linií, šířce proužků, typech gelů, separovaných molekulách apod., tak, aby bylo umožněno univerzální využití.

# LITERATURA

- [1] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 2003, 132 s. ISBN 80-863-6907-2.
- [2] KRÁLOVÁ, Blanka et al. *Bioanalytické metody*. 3., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická, 2001, 254 s. ISBN 80-708-0449-1.
- [3] KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2005, 258 s. ISBN 80-708-0586-2.
- [4] BÁRTOVÁ, Eva. *Molekulární biologie* [online]. 2011 [cit. 2012-12-07]. Dostupné z: <http://opvk2011.ptacisvet.cz/>
- [5] VÁCHA, František. *Elektromigrační metody*. Frantisek Vacha [online]. 2012 [cit. 2012-12-11]. Dostupné z: <http://www.umbr.cas.cz/~vacha/Vyuka/Metody/3hod%20Elektromigracni.pdf>
- [6] Genotypic Difference in Actinidin Concentration and Protease Activity in Fruit Juice of Actinidia Species. NISHIYAMA, Ichiro. *Genotypic Difference in the Fruit Components of Kiwifruit and Other Actinidia Species* [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: [http://www1.ttv.ne.jp/~kiwi/E\\_actinidin.htm](http://www1.ttv.ne.jp/~kiwi/E_actinidin.htm)
- [7] *Dipity* [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: [http://cdn.dipity.com/uploads/events/2447e08228d0efb3cb30671b3c03b225\\_1M.png](http://cdn.dipity.com/uploads/events/2447e08228d0efb3cb30671b3c03b225_1M.png)
- [8] Katalog. *P-Lab: Potřeby pro laboratoř* [online]. 2012 [cit. 2012-12-02]. Dostupné z: <http://www.p-lab.cz/katalog.pl>
- [9] RUML, Tomáš. *Genové inženýrství*. 1. vyd. Praha: VŠCHT, 2002, 270 s. ISBN 80-708-0499-8.
- [10] Isoelectric Focusing. *Gentaur* [online]. 2008 [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: <http://gentaur.com/isoelectrofocusing.htm>
- [11] GelRed™ & GelGreen™. *Cambridge Bioscience* [online]. 2012 [cit. 2012-12-06]. Dostupné z: <http://www.bioscience.co.uk/search/132643/>
- [12] Gel Electrophoresis. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Gel\\_electrophoresis](http://en.wikipedia.org/wiki/Gel_electrophoresis)

- [13] DNA ladder (Molecular Weight Marker). *Nippon Genetics Europe GmbH* [online]. [cit. 2012-12-12]. Dostupné z: <http://www.nippongenetics.eu/dnarna-electrophoresis/dna-ladder-molecular-weight-marker/>
- [14] Misc Tables. *DNA2.0* [online]. 2012 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: <https://www.dna20.com/tools.php?pageID=308>
- [15] DNA ladder. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001-, 2012-12-04 [cit. 2012-12-10]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/DNA\\_ladder](http://en.wikipedia.org/wiki/DNA_ladder)
- [16] SKUTKOVA, Helena, Martin VITEK, Sona KRIZKOVA, Rene KIZEK a Ivo PROVAZNIK. Preprocessing and classification of electrophoresis gel images using dynamic time warping. *International Journal of Electrochemical Science*. 2013.
- [17] Development of Management Tools for Control of Deposits In Landfill Leachate Drainage Systems. *University of South Florida* [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: <http://uweb.cas.usf.edu/landfill-research/>
- [18] STORCHOVÁ, Zuzana. Molekuly na povel III. *Vesmír*. 1998, č. 77.
- [19] Sanger sequencing. In: *Wikipedia: the free encyclopedia* [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2001- [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: [http://en.wikipedia.org/wiki/Sanger\\_method](http://en.wikipedia.org/wiki/Sanger_method)
- [20] Elektroforéza proteinů [video]. *Multimediální podpora výuky klinických a zdravotnických oborů: Portál Lékařské fakulty Masarykovy univerzity* [online]. 2007 [cit. 2012-12-11]. Dostupné z: <http://portal.med.muni.cz/clanek-425-elektroforeza-proteinu.html>
- [21] *Ecomed: Laboratorne prístroje a technika, pipety, phmetre* [online]. 2011 [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: <http://www.ecomed.sk/elektroforeza/HYDRASYS/CSF-ISO-9.jpg>
- [22] *Nemocnice Třinec* [online]. 2007 [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: [http://www.nemtr.cz/oddeleni/neluzkova/okb/Laboratorni\\_prirucka/html/HVEZDA\\_EAAU\\_soubory/image002.jpg](http://www.nemtr.cz/oddeleni/neluzkova/okb/Laboratorni_prirucka/html/HVEZDA_EAAU_soubory/image002.jpg)
- [23] JEDRA, M., N. EL KHATTABI, M. LIMOURI a A. ESSAID. Recognition of seed varieties using a time-delay neural network: analysis of electrophoretic images. *Computers and Electronics in Agriculture*. 1999, č. 22. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168169998000349>

- [24] LANE, Les. Gel electrophoresis artifacts. *Les Lane's home page* [online]. [cit. 2012-12-08]. Dostupné z: <http://lclane.net/text/highsalt.html>
- [25] RIO, D. C., M. ARES, G. J. HANNON a T. W. NILSEN. Polyacrylamide Gel Electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2010-06-01, roč. 2010, č. 6, pdb.prot5444-pdb.prot5444. ISSN 1559-6095. DOI: 10.1101/pdb.prot5444. Dostupné z: <http://www.cshprotocols.org/cgi/doi/10.1101/pdb.prot5444>
- [26] MACHADO, Alexei M. C., Mario F. M. CAMPOS, Ari M. SIQUEIRA, Osvaldo S. F. DE CARVALHO: *An Iterative Algorithm for Segmenting Lanes in Gel Electrophoresis Images*. 1997
- [27] SOUSA, Antonio V., Rui AGUIAR, Ana Maria MENDONCA a Aurelio CAMPILHO. Automatic Lane and Band Detection in Images of Thin Layer Chromatography. *Image Analysis and Recognition*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004. 2004, s. 158-165.
- [28] LABYED, Yassin, Naima KAABOUCHE, Richard R. SCHULTZ a Brij B. SINGH. Automatic Segmentation and Band Detection of Protein Images Based on the Standard Deviation Profile and its Derivative. *IEEE EIT 2007 Proceedings*. 2007.

# SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

1D	Jednorozměrná (one-dimensional)
2D	Dvourozměrná (two-dimensional)
CGE	Kapilární gelová elektroforéza (Capillary Gel Electrophoresis)
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (Deoxyribonucleic Acid)
EF	Elektroforéza
HPCE	Vysokoúčinná kapilární elektroforéza (High Performance Capillary Electrophoresis)
IEF	Izoelektrická fokusace (Isoelectric Focusing)
ITP	Izotachoforéza (Isotachophoresis)
MEKC	Micelární elektrokinetická chromatografie (Micellar Electrokinetic Chromatography)
PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Polymorfismus délky restričních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ribonukleová kyselina (Ribonucleic Acid)
SDS	Dodecylsírán sodný (Sodium Dodecyl Sulfate)
TAE	Tris-acetát EDTA pufr (Tris-Acetate EDTA buffer)
UV	Ultrafialové záření (Ultraviolet)

# SEZNAM PŘÍLOH

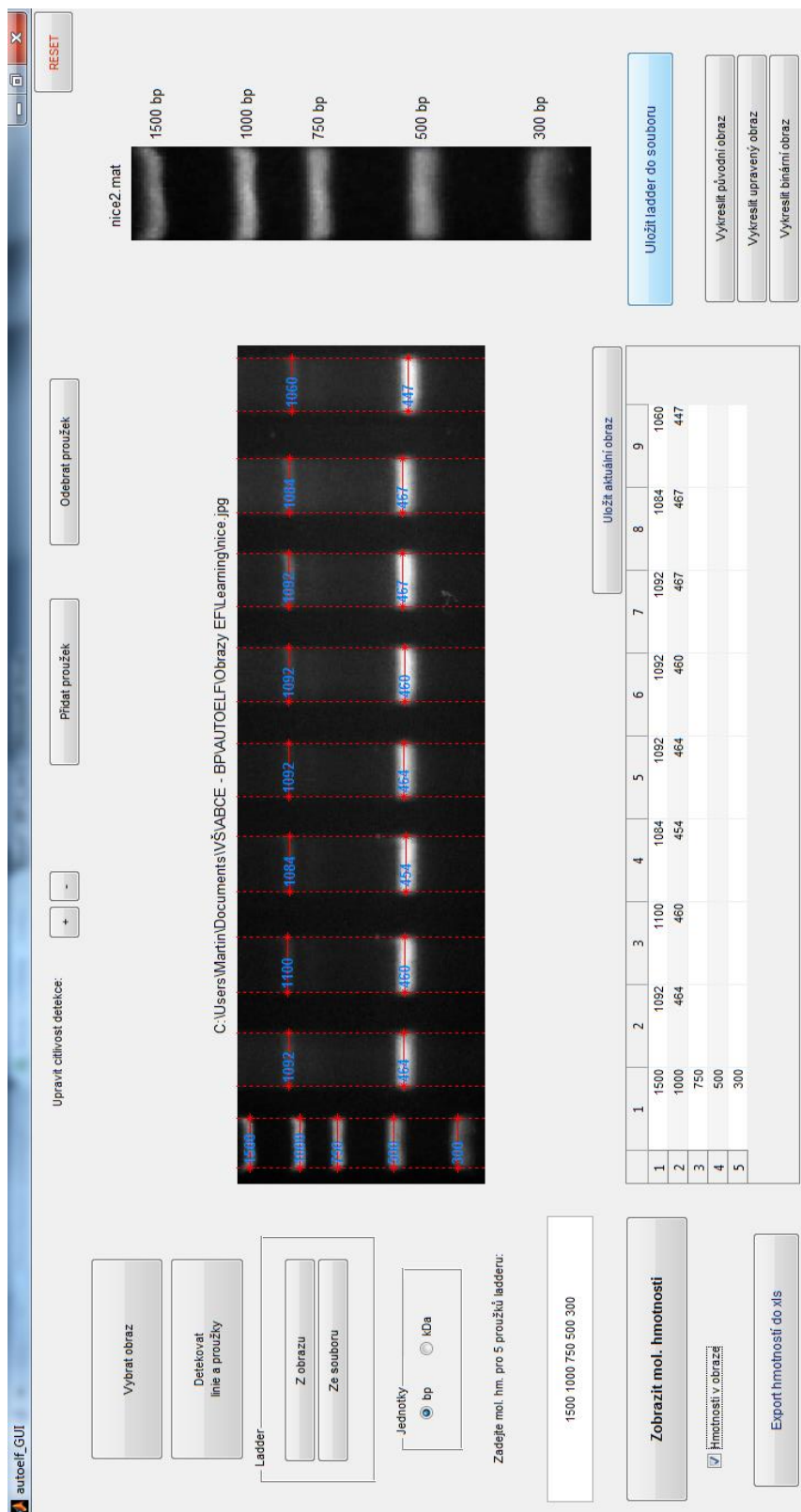
A.	Grafické uživatelské rozhraní programu .....	I
B.	Ukázka mol. hmotností exportovaných do MS Excel.....	II
C.	Elektroforeogram s hmotnostmi zobrazenými na pozicích proužků .....	II
D.	Elektroforeogram vzniklý převodem z 1D vertikálních profilů linií .....	II
E.	Zdrojový kód programu.....	III
a)	Funkce nacteni.m .....	III
b)	Funkce horprof.m.....	III
c)	Funkce vertprof.m .....	V
d)	Funkce hmotnosti.m .....	VI
e)	Funkce vykreslit.m.....	VI

## SEZNAM PŘÍLOH NA CD

- Zdrojové kódy programu
- Dva snímky gelů
- Připravený ladder
- Text bakalářské práce
- Stručný návod k použití programu



## A. GRAFICKÉ UŽIVATELSKÉ ROZHRAŇÍ PROGRAMU



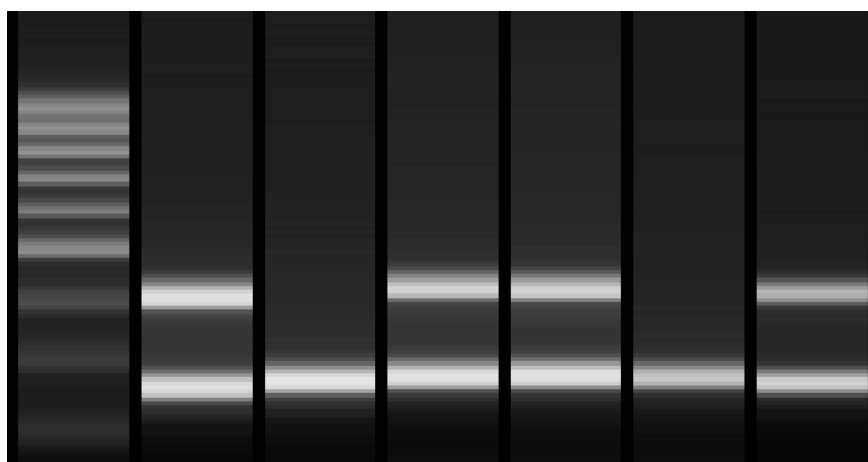
## B. UKÁZKA MOL. HMOTNOSTÍ EXPORTOVANÝCH DO MS EXCEL

Umístění elektroforeogramu:				C:\train.jpg		
Hmotnosti vzorků				[bp]		
1. linie	2. linie	3. linie	4. linie	5. linie	6. linie	7. linie
500	407	264	422	422	270	414
400	259		270	276		264
300						
200						

## C. ELEKTROFOREOGRAM S HMOTNOSTMI ZOBRAZENÝMI NA POZICÍCH PROUŽKŮ



## D. ELEKTROFOREOGRAM VZNIKLÝ PŘEVODEM Z 1D VERTIKÁLNÍCH PROFILŮ LINÍÍ



Obraz byl vytvořen převodem elektroforeogramu z Obr. 32.

## E. ZDROJOVÝ KÓD PROGRAMU

### a) Funkce nacteni.m

```
function [obr, obr_orig, umisteni, vyska, sirka] = nacteni

% NACTENI: Funkce pro výběr obrazu gelu dialogovým oknem, jeho načtení a
% úpravu kontrastu.
%
% Vstup: Výběr obrazu v dialogovém okně
%
% Výstupy:
% - obr ... obraz s upraveným kontrastem
% - obr_orig ... původní obraz bez úprav
% - umisteni ... umístění obrazu na disku
% - vyska, sirka ... rozměry obrazu

% Načtení a uložení obrazu:
[nazev,cesta] = uigetfile('*', 'Vyberte obrázek pro vyhodnocení');
umisteni = [cesta,nazev];
obr = imread(umisteni);

% Převod do vhodného formátu:
if ndims(obr) == 3          % Pokud je obraz barevný (je uložen ve 3D matici)...
    obr = rgb2gray(obr);    % ...převede se do stupňů šedi
end

obr = im2double(obr);       % Převod do double - výhodné pro mat. operace
obr_orig = obr;             % Uložení originálu před úpravami

if mean2(obr) > 0.5         % Prům. jas > 0.5 --> obraz má světlé pozadí, tmavé
    proužky...             proužky...
    obr = 1 - obr;         % Inverze obrazu (tmavé pozadí, světlé proužky)
end

% Normalizace jasu a gamma korekce:
obr_min = min(min(obr));
obr_max = max(max(obr));

obr = imadjust(obr,[obr_min; obr_max],[0;1],1.5);

% Uložení rozměrů obrazu:
[vyska sirka] = size(obr);
```

### b) Funkce horprof.m

```
function [zacatky, konce, pocet_linii] = horprof(obr,sirka)

% HORPROF: Funkce pro detekci linií v obrazu gelu.
%
% Vstupy:
% - obr ... obraz gelu
% - sirka ... šířka obrazu
%
% Výstupy:
% - zacatky, konce ... polohy hranic det. linií
% - pocet_linii ... počet det. linií

profilh = std(obr);
```

```

profilh([1 end]) = mean(profilh);          % Umělý pík na okrajích pro lepší det.
krajních linií
profilh([2 end-1]) = 0;                    % Nula před umělými píky (lepší detekce)

% Okno pro det. minim:
delka_okna = floor(sirka/6);
min_hod = [];
min_pol = [];
pol_minula = 0;

% Detekce minim:
for i = 1:length(profilh)-delka_okna
    okno = profilh(i:i+delka_okna);
    [hod pol] = min(okno);                  % Nalezení minina v okně
    if pol ~= pol_minula                    % Pokud pol. min. v okně nesouhlasí s
předch. pol. ...
        min_hod = [min_hod hod];           % Uložení hodnot min.
        min_pol = [min_pol pol+i-1];       % Ul. pol. min. (-1 kvůli indexaci okna)
    end
    pol_minula = pol;                       % Ul. akt. pol. pro další kolo cyklu
end

% Vyřazení několikanásobně uložených totožných minim:
[min_pol,kde] = unique(min_pol);
min_hod = min_hod(kde);

% Proložení křivky polohami minim:
obalka = interp1(min_pol,min_hod,1:length(profilh)); % Proložená minima
obalka(isnan(obalka)==1) = 0;                    % Výmaz NaN
profilh2 = profilh - obalka;                     % Odečtení proložené
křivky od profilu

% Normalizace úseků mezi minimy:
[~, nuly] = findpeaks(-profilh2,'MINPEAKHEIGHT',-
0.03,'MINPEAKDISTANCE',round(delka_okna/3)); % Det. mezer mezi liniemi (blízké
nule)

% Normalizace úseků mezi nulovými mezerami:
for i = 1:length(nuly)-1
    okno = profilh2(nuly(i):nuly(i+1));
    okno = okno/max(okno);
    profilh2(nuly(i):nuly(i+1)) = okno;
end

profilh2(profilh2<0) = 0;                    % Ořez záporných hodnot

% Detekce linií:

prah_h = 0.4;                               % Nastavení pevného prahu

zacatky = [];
konce = [];

for i = 2:length(profilh2)-1

    if profilh2(i) > prah_h && profilh2(i-1) < prah_h % Výběr prvního
nadprahového bodu
        zacatky = [zacatky i];                  % Uložení aktuální
hodnoty na konec vektoru
    end

    if profilh2(i) > prah_h && profilh2(i+1) < prah_h % Výběr posledního
nadprahového bodu
        konce = [konce i];                      % Uložení aktuální
hodnoty na konec vektoru
    end
end

```

```

end

end

% Odstranění příliš tenkých linií (šířka < 1/2 mediánu šířek linií):
zacatky_puv = zacatky;
med_sirka = median(konce-zacatky);
zacatky(konce-zacatky < med_sirka/2) = [];
konce(konce-zacatky_puv < med_sirka/2) = [];

% Uložení konečného počtu linií:
pocet_linii = length(zacatky);

```

### c) Funkce vertprof.m

```

function [polohy, profilv] = vertprof(obr, zacatky, konce, pocet_linii, vyska,
citlivost)

% VERTPROF: Funkce pro detekci proužků v hranicích detekovaných linií.
%
% Vstupy:
% - obr ... obraz gelu
% - zacatky, konce ... polohy hranic det. linií
% - pocet_linii ... počet det. linií
% - vyska ... výška obraz
% - citlivost ... koef. pro úpravu citlivosti detekce
%
% Výstupy:
% - polohy ... matice s polohami det. proužků
% - profilv ... matice s jasovými profily proužků

% Vypočítání profilu pro všechny proužky:
profilv = zeros(length(zacatky),vyska); % Inicializace matice pro ukládání
jas. profilů

for i = 1:length(zacatky) % Opakování cyklu podle počtu det. linií
    for j = 1:vyska % Cyklus podle délky linie (výšky obrazu)
        usek = obr(j,zacatky(i):konce(i)); % Výběr části obr. v hranicích
        linie
        profilv(i,j) = mean(usek); % Vert. profil průměrem z úseku
    end
end

end

% Detekce proužků:
polohy = [];

for i = 1:pocet_linii
    profil = profilv(i,:);
    obalka = abs(hilbert(profil)); % Obálka signálu
    soucet = profil + obalka;
    soucet = smooth(soucet,3); % Vyhlazení prům. filtrem
    prah = 0.3*max(profil)+citlivost; % Nastavení prahu detekce
    [~, polohy_piku] = findpeaks(soucet, 'MINPEAKHEIGHT', prah, 'MINPEAKDISTANCE', 5);
    polohy(i,1:length(polohy_piku)) = polohy_piku;
end

end

polohy(polohy==0) = NaN; % Nahrazení nul NaN (pro lepší zpracování)

```

## d) Funkce hmotnosti.m

```
function [hm, polohy_lad] = hmotnosti(polohy, molhm_lad)

% HMOTNOSTI: Funkce pro výpočet molekulárních hmotností vzorků
% v obrazu gelu.
%
% Vstupy:
% - polohy ... matice s polohami det. proužků
% - molhm_lad ... mol. hmotnosti odpovídající proužkům ladderu
%
% Výstupy:
% - hm ... matice vypočtených hmotností vzorků
% - polohy_lad ... polohy proužků ladderu (upr. podle akt. ladderu v obr.)

polohy_lad = polohy(1,:); % Uzpůsobení ladderu ze souboru
aktuálního ladderu

polohy_lad(isnan(polohy_lad)==1) = []; % Pro laddery s menším počtem proužků
než v je dalším liniích
px_ladder = polohy_lad - polohy_lad(1); % Zarovnání (první proužek na 0 px)
pr_ladder = px_ladder/px_ladder(end) *100; % Přepočet abs. poloh na rel. (ladder)

px_obraz = polohy - polohy(1,1); % Srovnání všech poloh podle první
polohy ladderu
pr_obraz = px_obraz/px_ladder(end) *100; % Přepočet abs. polohy na rel. (vzorky)
hm = interp1(pr_ladder,molhm_lad,pr_obraz,'pchip'); % Interpolace body ladderu

xx = -50:150; % Osa od -50 % výšky do 150 %
výšky
il = interp1(pr_ladder,molhm_lad,xx,'pchip'); % Celý průběh funkce výška-molhm

hm = round(hm); % Zaokrouhlení hmotností
hm = hm'; % Transpozice matice pro snazší zpracování

% Vykreslení funkce do nového okna:
figure
plot(pr_ladder,molhm_lad,'b*')
hold on
plot(xx,il,'r')
hold off
title('Funkce pro výpočet mol. hm. vzorků')
xlabel('Procenta výšky proužků')
ylabel('Mol. hm.')
legend('Hodnoty z ladderu','Proložený průběh')
```

## e) Funkce vykreslit.m

```
function vykreslit(polohy, zacatky, konce, pocet_linii, vyska, umisteni)

% VYKRESLIT: Funkce pro vykreslení značek detekovaných proužků do obrazu
% gelu.
%
% Vstupy:
% - polohy ... vektor det. poloh proužků
% - zacatky, konce ... polohy hranic linií
% - pocet_linii ... počet det. linií
% - vyska ... výška obrazu
% - umisteni ... umístění obrazu na disku
%
% Výstup: grafický
```

```

[~, pocet_prouzku] = size(polohy);

hold on
for i = 1:pocet_linii % Cyklus pro počet linií

    % Značky ohraničující linie:
    plot([zacatky(i) zacatky(i)], [1 vyska], 'r:', [konce(i) konce(i)], [1 vyska], 'r:')

    for j = 1:pocet_prouzku % Cyklus pro počet proužků
        if isnan( polohy(i,j) ) == 0 % Pokud není poloha NaN...
            % Značky pro proužky:
            plot([zacatky(i) konce(i)], [polohy(i,j) polohy(i,j)], '*-
r', 'LineWidth', 1.2)
        end
    end

end
hold off

% Vypsání umístění obrazu:
title(umisteni, 'interpreter', 'none');

```